Disclaimer

Für die Vollständigkeit und Richtigkeit der einzelnen Inhalte der „Entwicklungsbiologie für BScBiol/BScMLS/BA“ kann keine Gewähr übernommen werden. Es ist nicht gestattet, diese Vorlesung oder Teile derselben ohne ausdrückliche Genehmigung der Dozentinnen und Dozenten für die Wiedergabe im Druck, Vorträge oder eine andere Art der Veröffentlichung, auch nicht im Internet, zu verwenden. Für Teile der Abbildungen liegen die Rechte bei Buchverlagen, wissenschaftlichen Zeitschriften oder bei den Dozentinnen und Dozenten dieser Veranstaltung.

Arp Schnittger

Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Universität Hamburg
Bachelorstudiengang Biologie

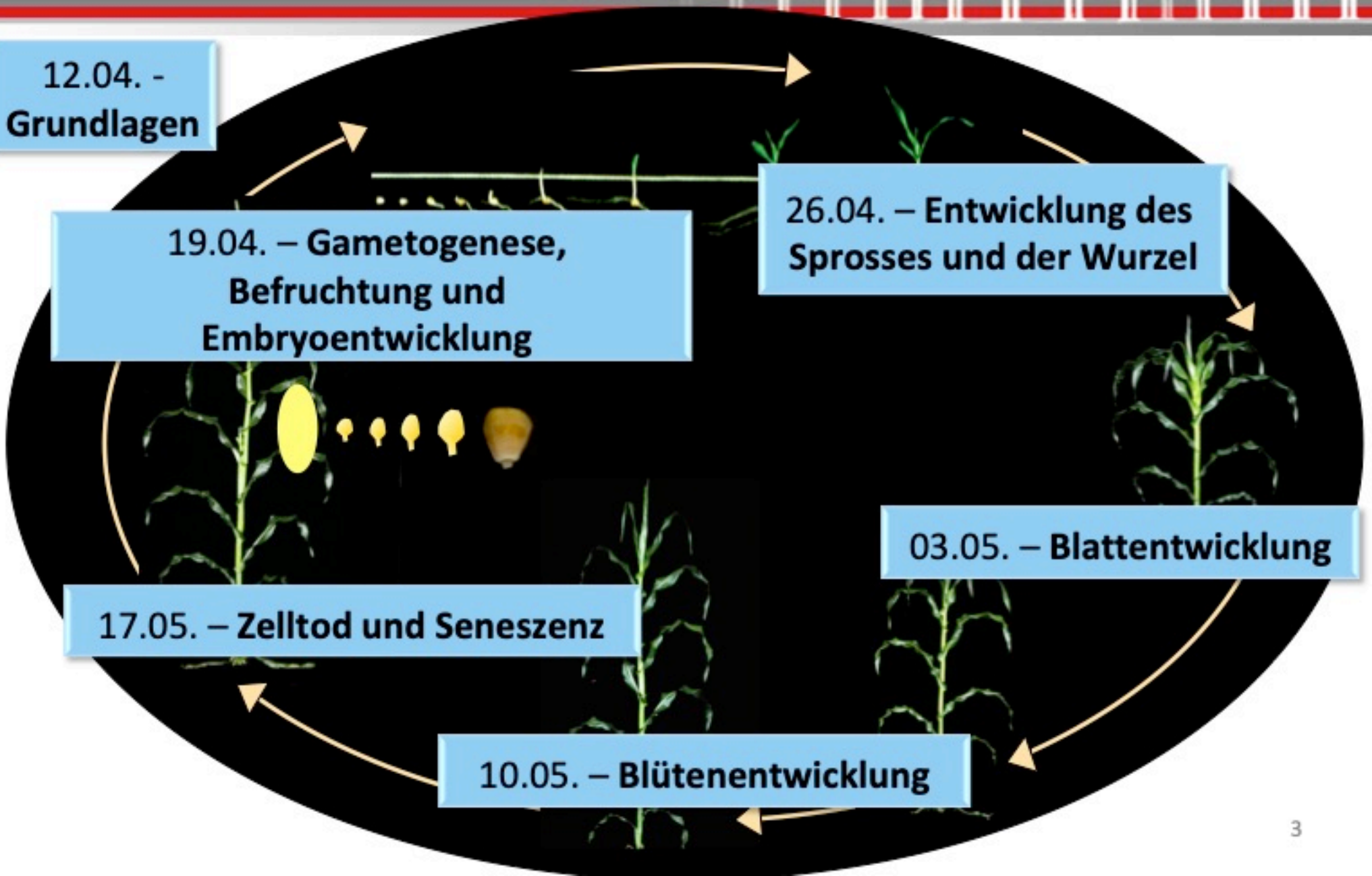
Entwicklungsbiologie

Sommersemester 2021

Arp Schnittger
Biozentrum Klein Flottbek

arp.schnittger@uni-hamburg.de

Vorlesung Entwicklungsbiologie SoSe 2021


12.04. - Grundlagen
19.04. – Gametogenese, Befruchtung und Embryoentwicklung
26.04. – Entwicklung des Sprosses und der Wurzel
03.05. – Blattentwicklung
10.05. – Blütenentwicklung
17.05. – Zelltod und Seneszenz

Konzepte der Vorlesung

Programmierter Zelltod, Apoptose, Nekrose

Zelltod während der pflanzlichen Entwicklung

Zwei Beispiele:

- **Absterben der Papillazellen**
- **Zelltod in der Wurzelhaube**

Methodik in dieser Vorlesung

PI und FDA – zwei sehr nützliche Farbstoffe

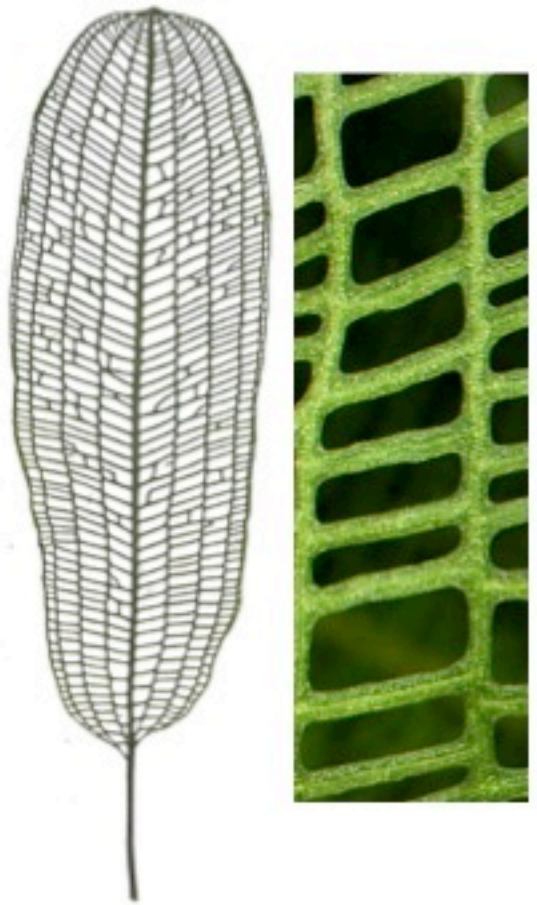
Umwandlung eines transkriptionellen Aktivators in einen spezifischen Repressor

Zelltod und Seneszenz

Wie kommen die Löcher in das Blatt?

- Einbuchtungen, Fiederblättrigkeit und andere Blattformen können durch **differentielles Wachstum** erzeugt werden (➔ VL Blattentwicklung)

- **Aber Löcher?** Z.B. einige Arten in der Familie der *Araceae* (Aronstabgewächse) haben durchbrochene Blätter



Aponogeton madascariensis

Monstera deliciosa

Gentiana lutea

Programmierter Zelltod versus Nekrose

Programmierter Zelltod
(engl. Programmed cell death, PCD)

genau geplanter und genau kontrollierter Selbstmord einer Zelle

- aktive Entscheidung
- abhängig von der Aktivierung bestimmter Gene und Proteine
- betrifft oft nur isolierte, einzelne Zellen

Nekrose
(engl. necrosis)

zufälliger und unkontrollierter Zelltod

- passiver Zelltod
- oft durch Verletzung oder andere äußere Einflüsse
- betrifft oft eine Zellgruppe

Programmierter Zelltod versus Nekrose

Programmierter Zelltod
(engl. Programmed cell death, PCD)

genau geplanter und genau kontrollierter Selbstmord einer Zelle

- aktive Entscheidung
- abhängig von der Aktivierung bestimmter Gene und Proteine
- betrifft oft nur isolierte, einzelne Zellen

Nekrose
(engl. necrosis)

zufälliger und unkontrollierter Zelltod

- passiver Zelltod
- oft durch Verletzung oder andere äußere Einflüsse
- betrifft oft eine Zellgruppe

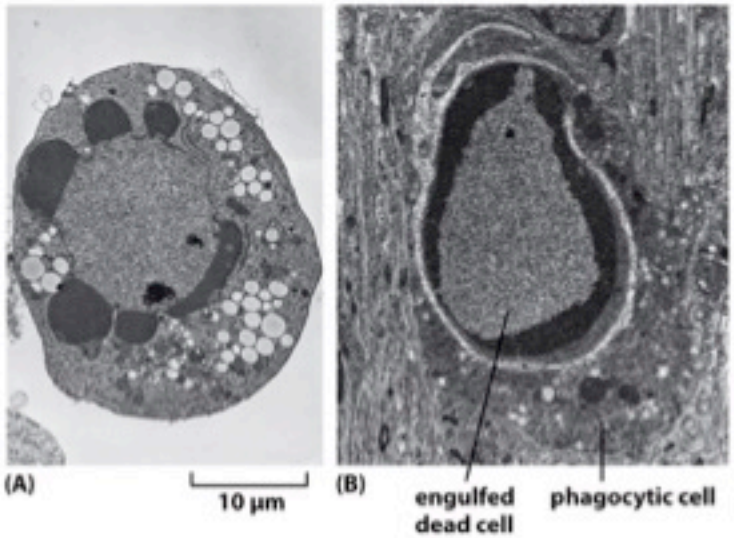
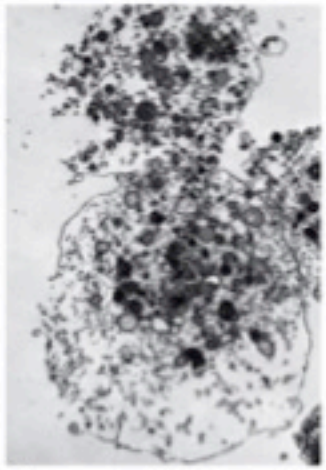


Figure 18-1 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)



Warum ist es wichtig, dass Zellen sterben?

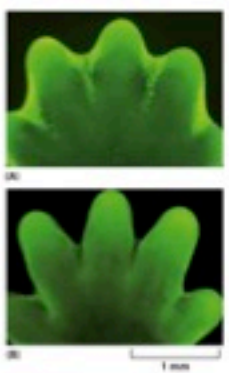
oder in anderen Worten:

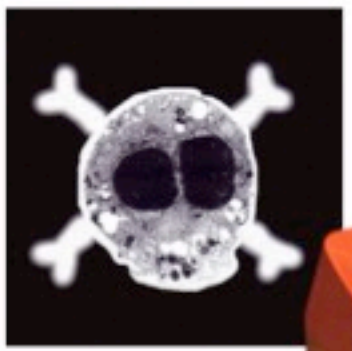
Warum hat sich Zelltod entwickelt ? Gibt es Selektionsvorteile für Arten mit PCD?

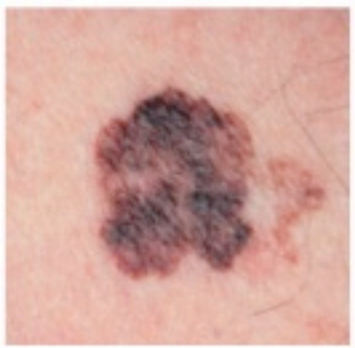
Welche Zellen werden getötet?

- Zellen, die eine zeitliche beschränkte Funktion haben
- infizierte Zellen
- entartete Zellen, Krebszellen
- alte Zellen
- Zellen, die ersetzt werden müssen (zelllärer Turnover)
- beschädigte Zellen
- Zellen, die permanenten Stress ausgesetzt und damit oft beschädigt werden, z.B. Epithelzellen oder Hautzellen (mechanischer Stress)
- Zellen des Immunsystems, die auf den eignen Zellen reagieren (autoimmun reaktiv)
- Herstellung von Strukturen aus toten Zellen
- Adaptation an eingeschränkte Ressourcen
- ...

Bedeutung von PCD in Tieren







Als Teil des Entwicklungsprogramms

- **Entfernen von Zellen am Ende ihrer Lebensphase**
- **„formen" von Organen, Entfernung von überflüssigen/nicht (mehr) gewünschten Strukturen**

Interaktion mit der Umwelt

- **Töten von beschädigten Zellen und entarteten Zellen**
- **Töten von infizierten Zellen**

Deregulation führt zu schweren Krankheiten

- zu viel und/oder an der „falschen" Stelle: z.B. bei neurodegenerativen Erkrankungen
- zu wenig: z.B. bei Krebs oder Autoimmunerkrankungen

Wie werden Zellen getötet?

Der Zelltod kann durch eine oder mehrere der folgenden Prozesse erfolgen (oft in Kombination und einer bestimmten Abfolge):

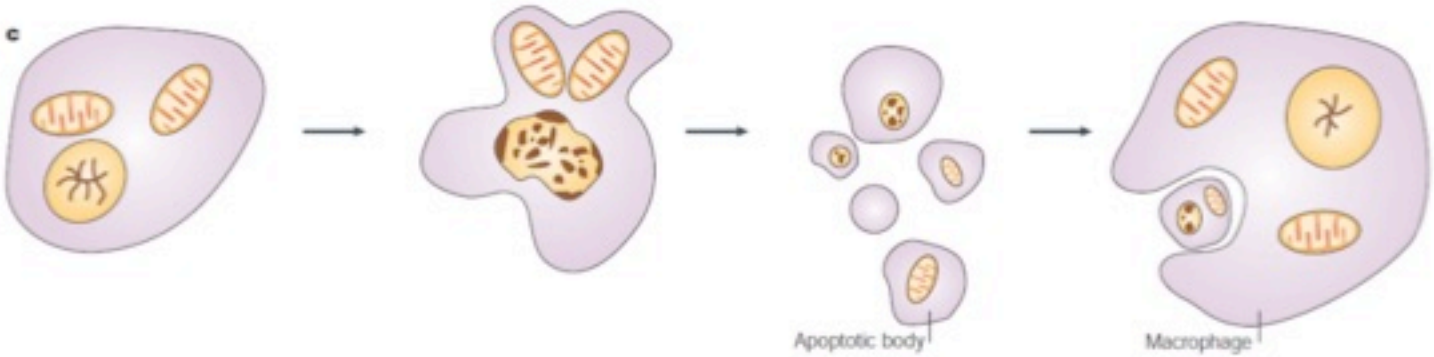
- Abgabe von Proteasen aus Vakuolen und/oder Lysosomen
- Stopp der Translation
- Stopp Transkription
- Produktion von *reactive oxygen species* (ROS)
- Zerstörung von Mitochondrien
- Zerstörung der Plasmamembran
- DNA Fragmentierung
- ...

Eine bestimmte und in Tieren sehr weit-verbreitete Art des programmierten Zelltodes ist die **Apoptose**, eine andere die Autophagozytose (Autophagy).

Apoptose ist eine spezielle Art von PCD in Tieren

Merkmale von Apoptose

- schrumpfen und abrunden der Zellen durch den Abbau des Zytoskelets
- Verlust der Zell-Zell Kontakte in Geweben
- Bläschenbildung und Auswölbungen an der Plasmamembran (Membrane blebs)
- Kondensation des Chromatins und Anlagerung an der Kernmembran (Pyknose)
- Fragmentierung der DNA (*DNA laddering*)
- Auseinanderbrechen der Zellen in apoptotische Vesikel, die dann phagozytiert werden



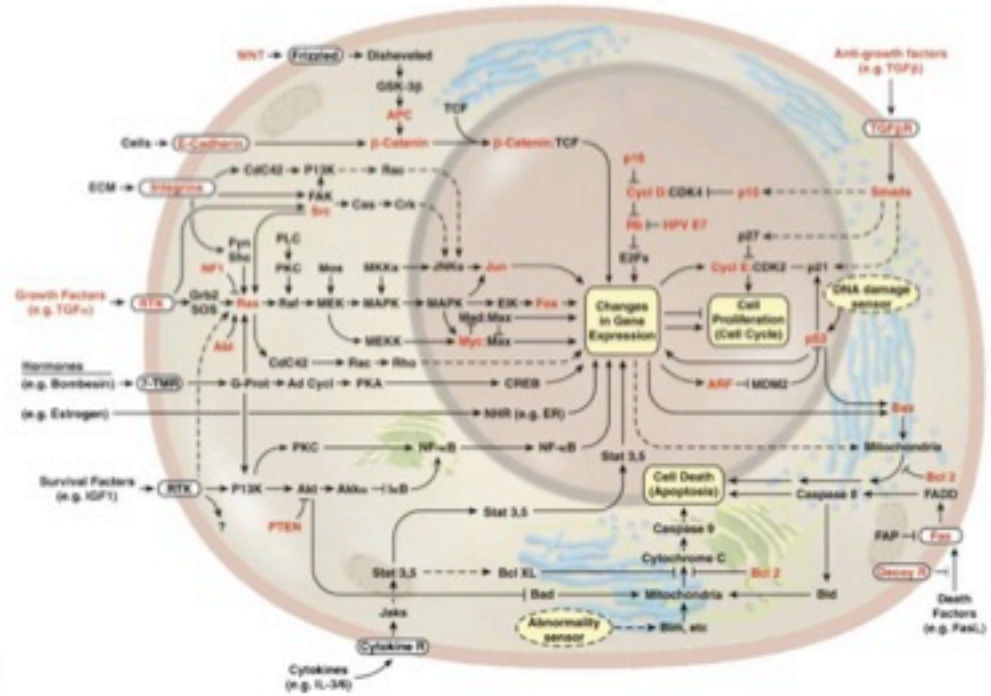
notwendig bei der Entwicklung von z.B.:

- Neuronen
- Mittelohr
- Vaginalöffnung
- Finger- und Zehenzwischenräume
- Abbau nicht mehr benötigter Strukturen z.B. dem Schwanz der Kaulquappe

Apoptose in Metazoan ist sehr gut untersucht und verstanden

Generegulation

Signal-Relay



Rezeptoren

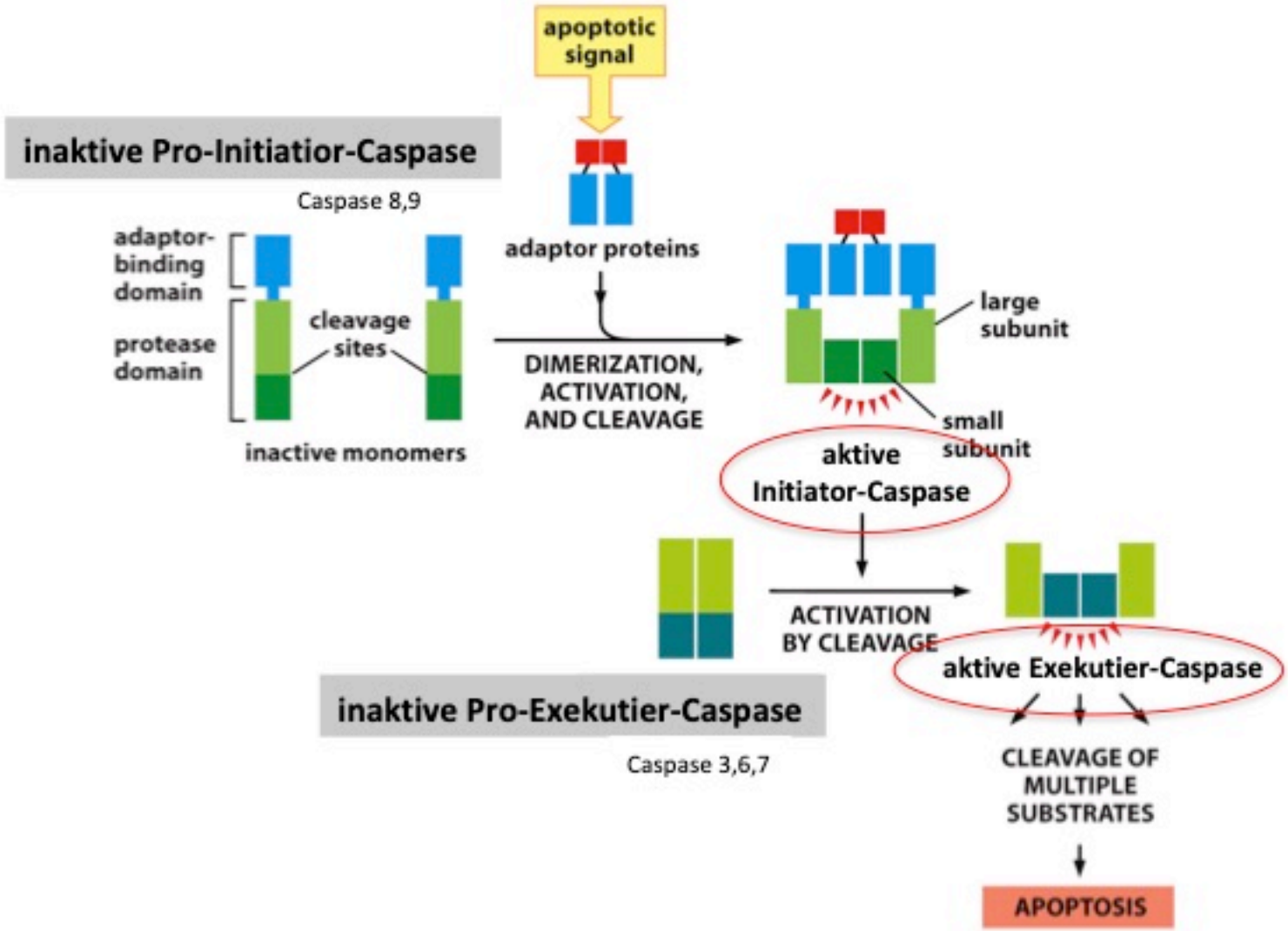
upstream Regulatoren
(Bax, Bcl-2)

downstream Ausführer
(Caspasen)

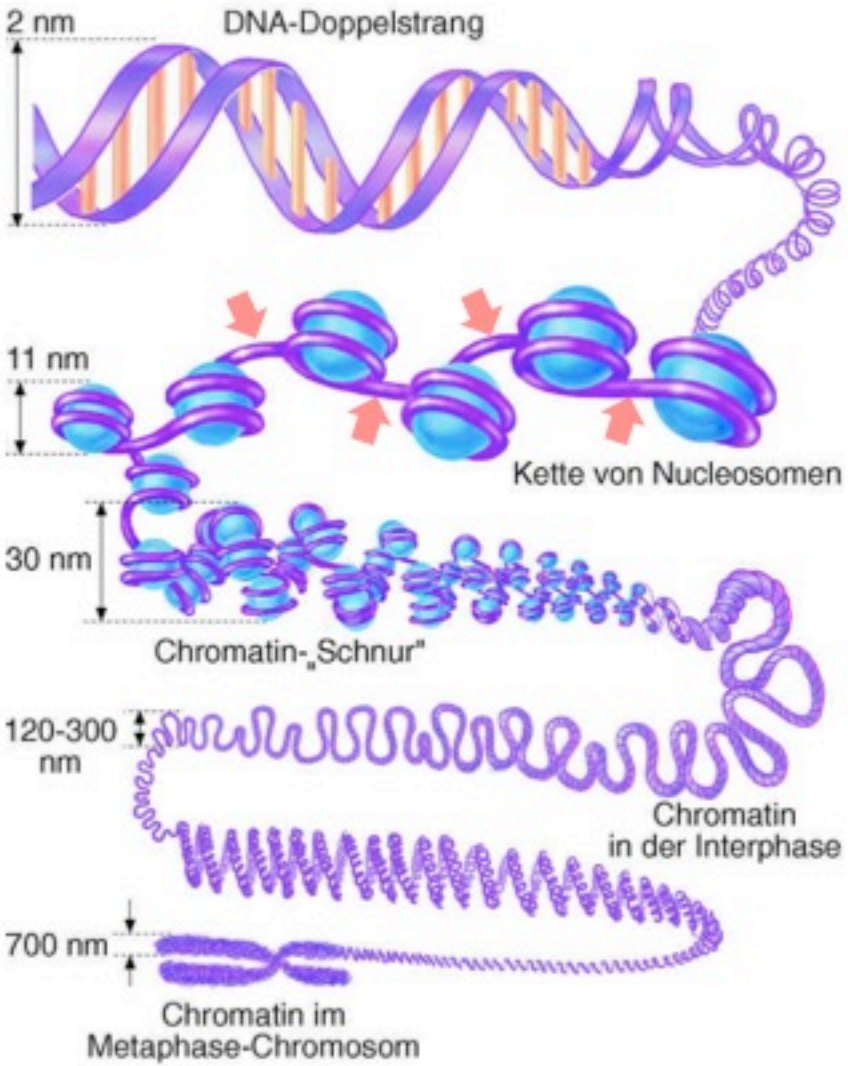
Hanahan & Weinberg, Cell, 2000

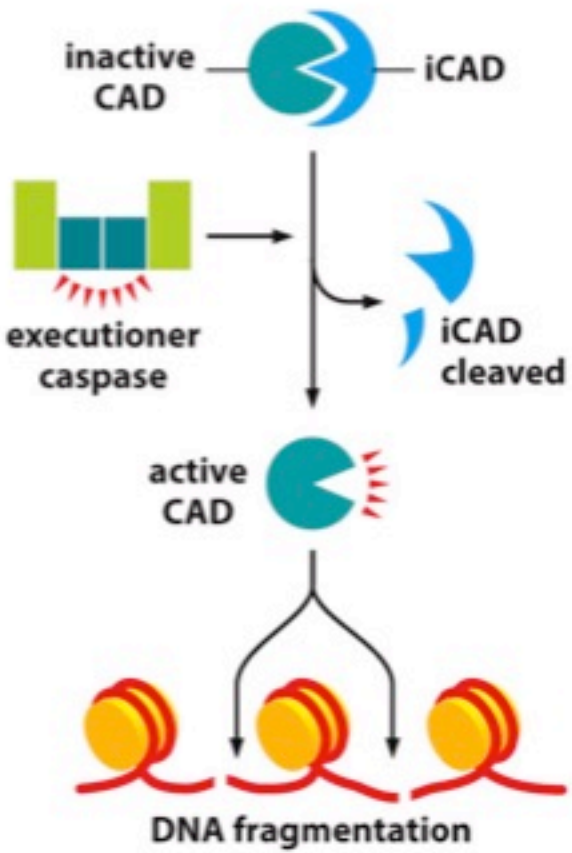
Caspasen

Cysteine-**Asp**artic **P**rote**ASE**s oder **C**ysteine-dependent **AS**partate-directed **P**rote**ASE**s
Cysteinproteasen, die Zielproteine an einer Peptidbindung C-Terminal von Aspartat schneiden



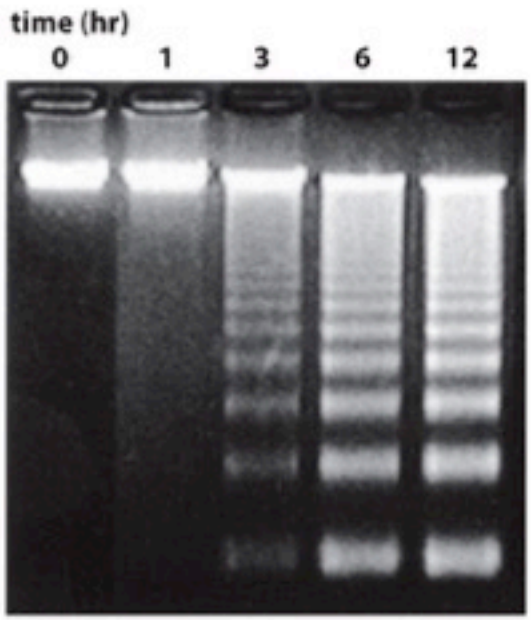
DNA laddering





1,75 DNA-Windungen
pro Nucleosom = 146 Basenpaare
Linker bis ca. 60 Basenpaare

Ca/Mg-abhängige Endonukleasen (Caspase-Activated DNase, CAD) spalten die DNA in ~ 180 bp Multimere



Bcl-2 Zelltodregulatoren

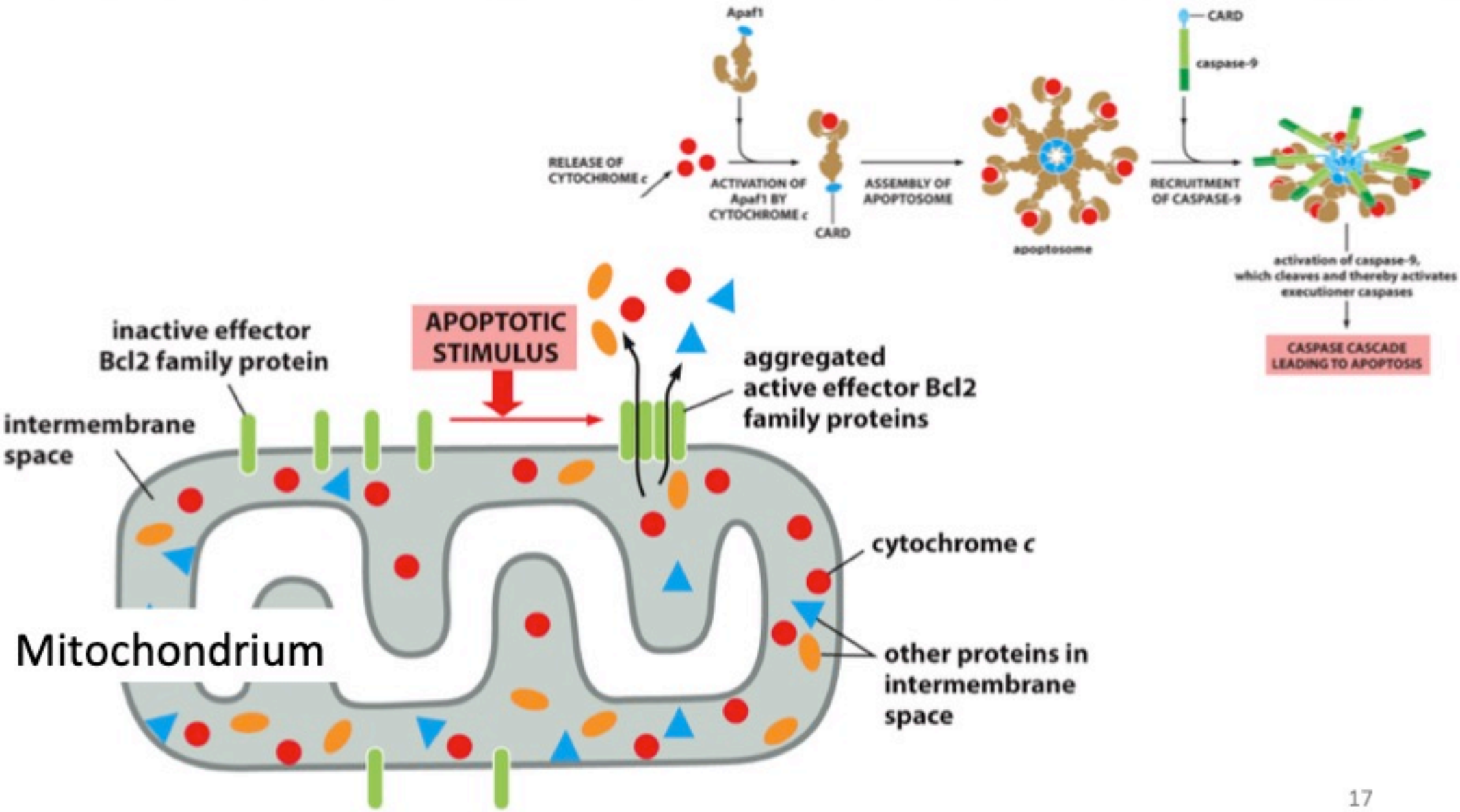
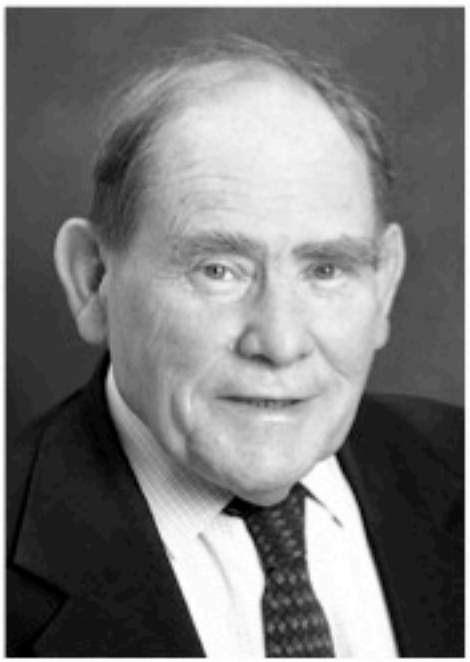


Figure 18-9 Molecular Biology of the Cell 6e (© Garland Science 2015)

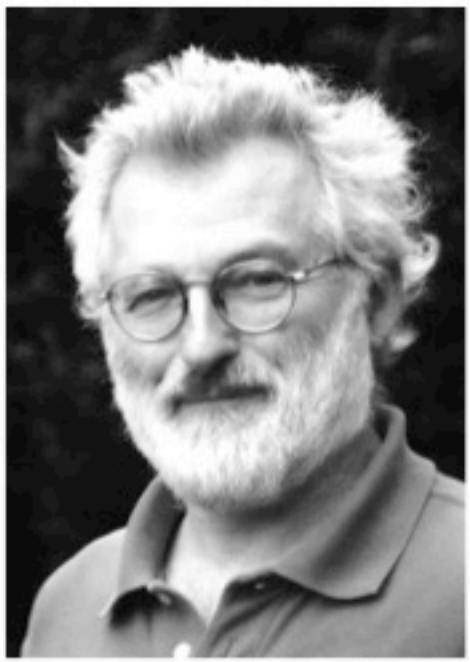
Apoptose ist in Metazoan sehr gut untersucht und verstanden

Nobelpreis in Physiologie und Medizin in 2002
Sydney Brenner, **H. Robert Horvitz** und **John E. Sulston**
for their discoveries concerning "genetic regulation of organ development and programmed cell death"



Sydney Brenner

H. Robert Horvitz



John E. Sulston

Caenorhabditis elegans: 959 somatische Zellen im adulten Stadium
→ 131 Zellen sterben während der normalen Entwicklung

Konzepte der Vorlesung

Programmierter Zelltod, Apoptose, Nekrose

Zelltod während der pflanzlichen Entwicklung

Zelltod während des pflanzlichen Lebens

Umweltbedingt

Pathogen-Angriff (HR)

Trocken
Temperatur
Hypoxia
DNA Schäden
Salz
} Stress

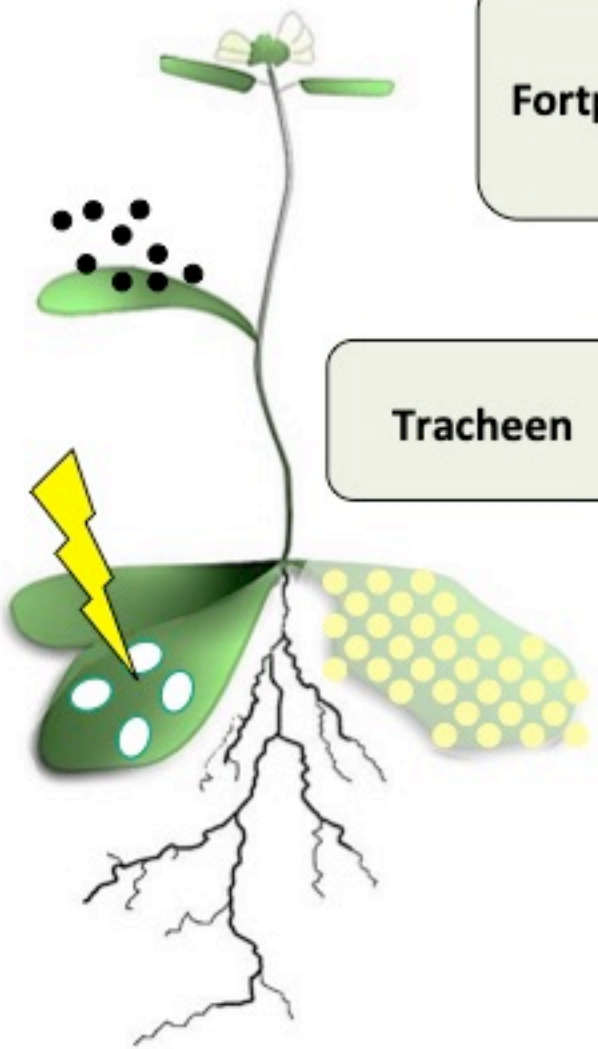
Entwicklungsbedingt

Fortpflanzung { Blütenorgane, Gametophyten, Samen

Tracheen

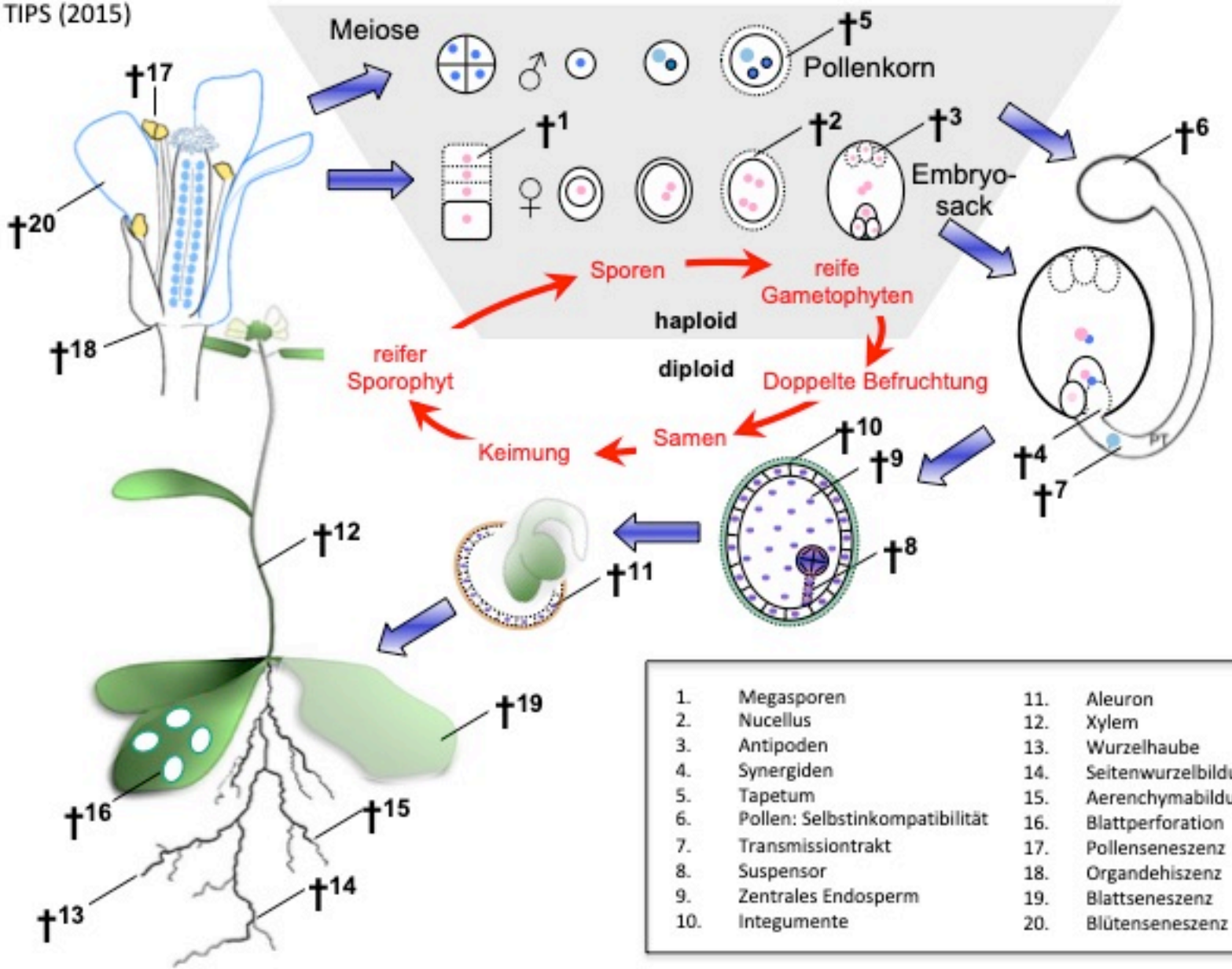
Blattentwicklung
Ausnahme: *Monstera deliciosa*

Seneszenz



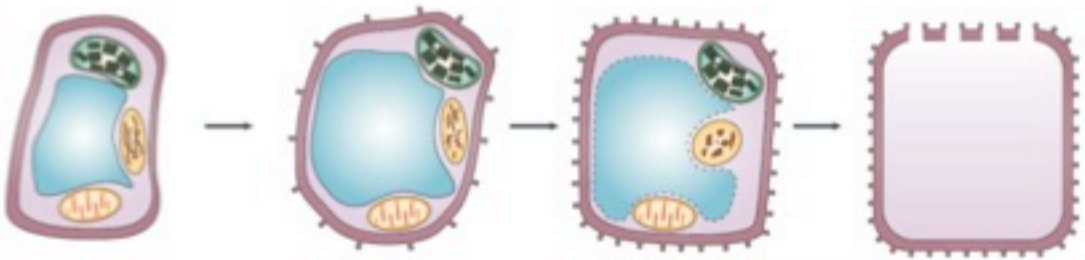
Mehr als 20 verschiedene Zelltypen sterben bei der Entwicklung von Pflanzen

nach Van Hautegem et al. TIPS (2015)



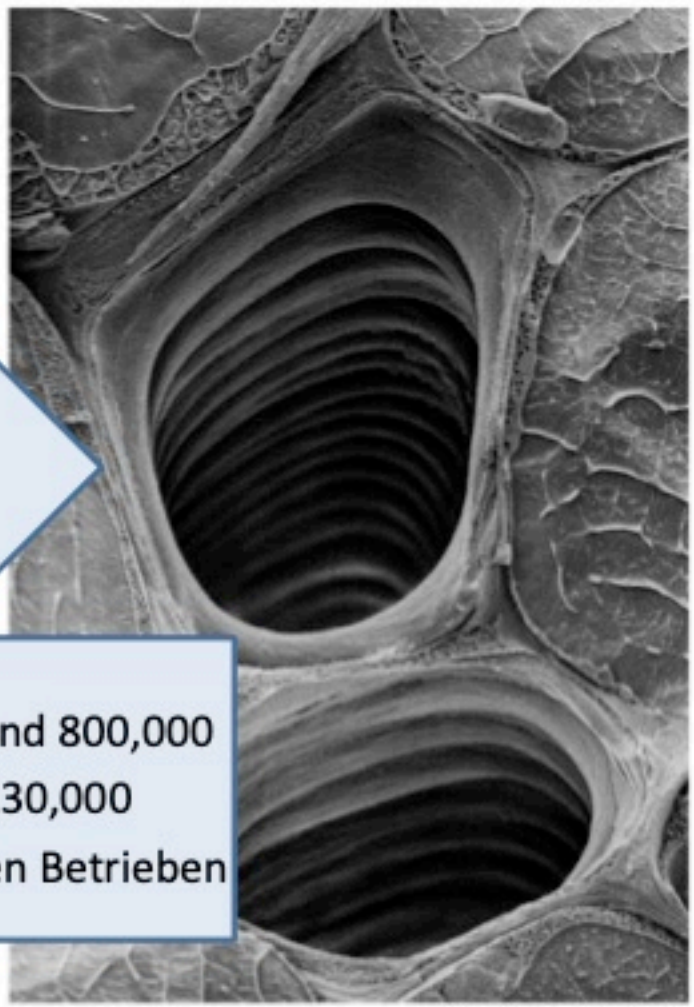
1.	Megasporen	11.	Aleuron
2.	Nucellus	12.	Xylem
3.	Antipoden	13.	Wurzelhaube
4.	Synergiden	14.	Seitenwurzelbildung
5.	Tapetum	15.	Aerenchymabildung
6.	Pollen: Selbstinkompatibilität	16.	Blattperforation
7.	Transmissiontrakt	17.	Pollenseneszenz
8.	Suspensor	18.	Organdehiszenz
9.	Zentrales Endosperm	19.	Blattseneszenz
10.	Integumente	20.	Blütenseneszenz

Zelltod in Pflanzen – Bildung von Tracheen



Durch PCD werden die Tracheen-Elemente gebildet, die "funktionalen Röhren" des Xylems

allein in Deutschland 800,000 Beschäftigte in > 130,000 Holzverarbeitenden Betrieben

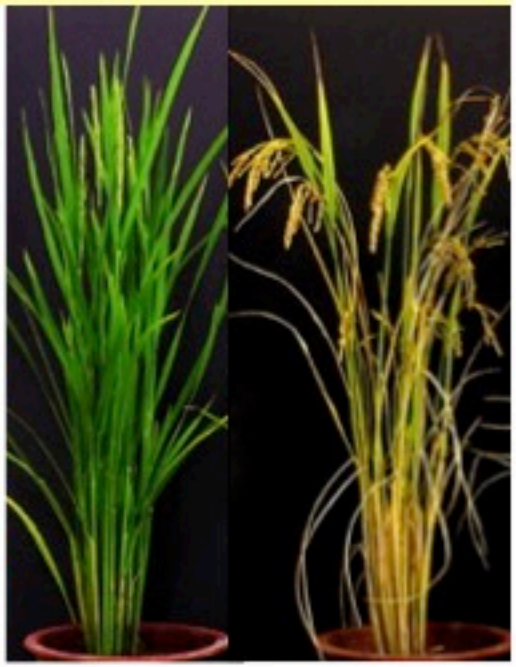


Current Opinion in Plant Biology

from Roberts, K., and McCann, M.C. (2000). Xylogenesis: the birth of a corpse. Current Opinion in Plant Biology 3: 517-522; Lam, E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5: 305 – 315

Blattseneszenz: Nährstoff-Recycling gefolgt von Zelltod

Bei der Blattseneszenz werden Nährstoffe in Samen verlagert (Einjährige) oder bei Mehrjährigen in die Rinde und andere Gewebe

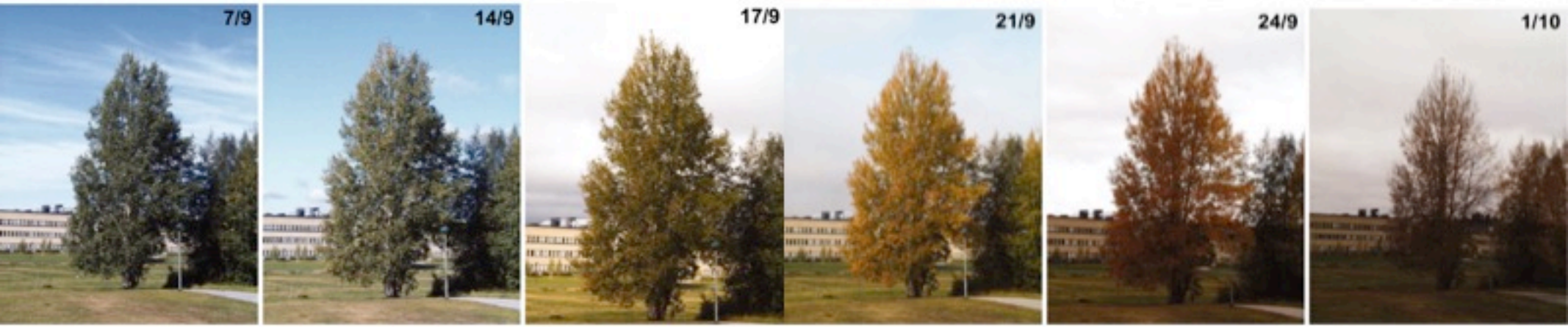


Seneszenz:

- ist ***nicht*** Necrose
- ist ein ***aktives*** Entwicklungs-programm, das einer genetischen Kontrolle unterliegt

Photos courtesy Tom Donald; Park, S.-Y., er al. (2007). The senescence-induced Staygreen protein regulates chlorophyll degradation. Plant Cell. 19: 1649-1664

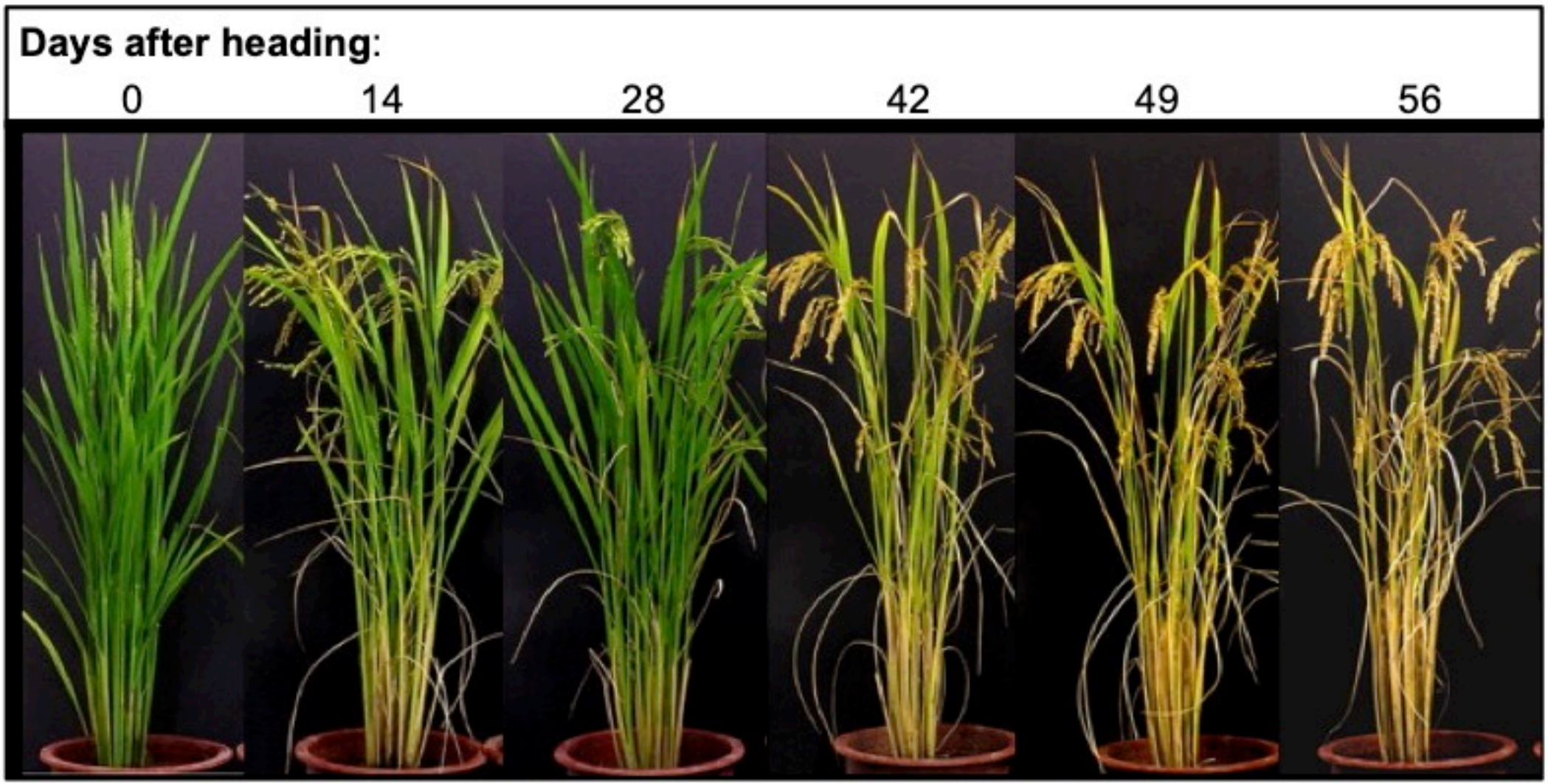
Die Photoperiode induziert Blattseneszenz in Herbstblättern



Tageslänge und **Temperatur** bedingen die Initiation und die Geschwindigkeit der Seneszenz.

Bhalerao, R., Keskitalo, J., Sterky, F., Erlandsson, R., Björkbacka, H., Birve, S.J., Karlsson, J., Gardeström, P., Gustafsson, P., Lundeberg, J., and Jansson, S. (2003). Gene Expression in Autumn Leaves. Plant Physiology 131: 430-442.

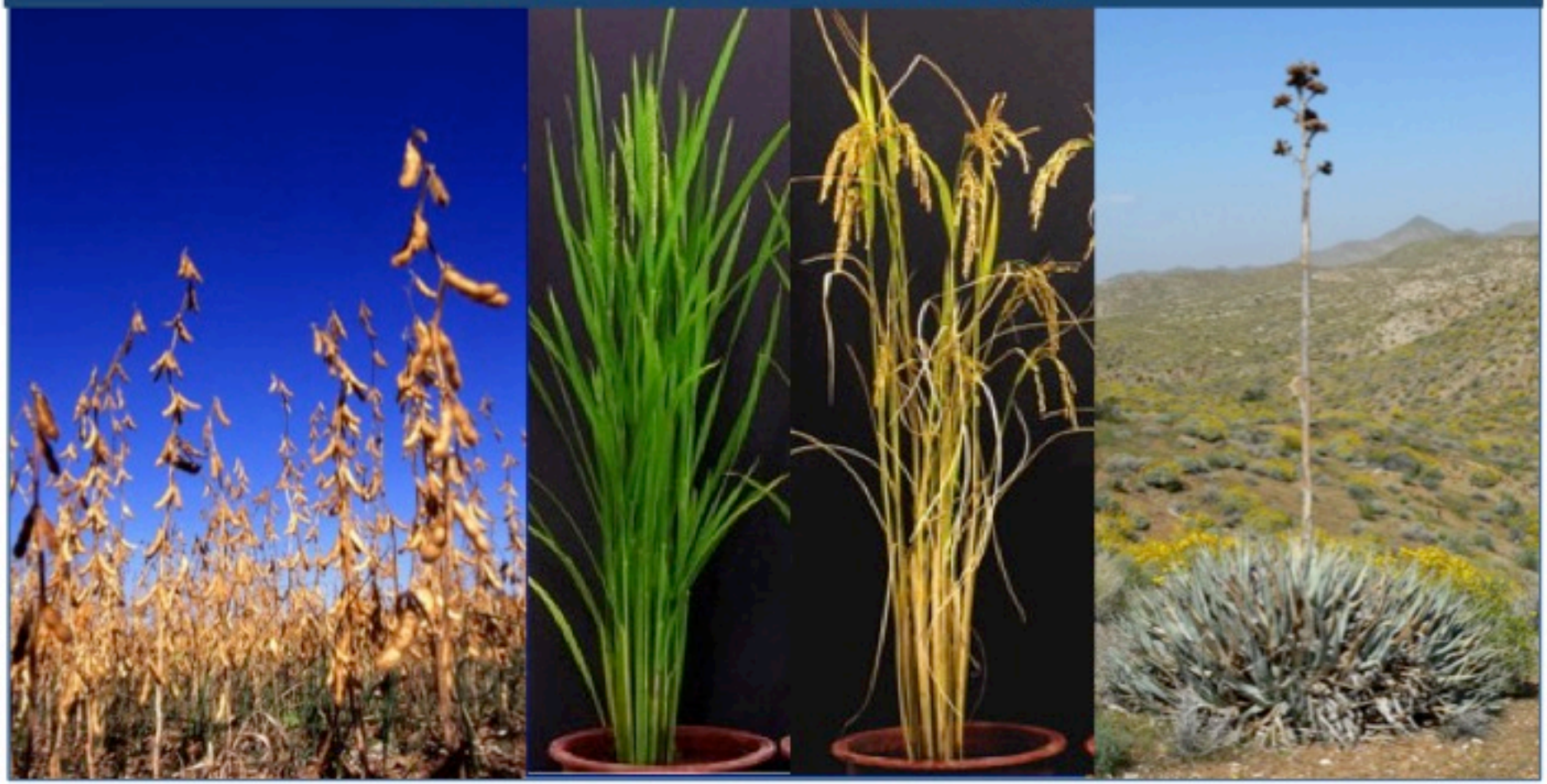
Blattsenezenz während der Samenreifung



Park, S.-Y., Yu, J.-W., Park, J.-S., Li, J., Yoo, S.-C., Lee, N.-Y., Lee, S.-K., Jeong, S.-W., Seo, H.S., Koh, H.-J., Jeon, J.-S., Park, Y.-I. and Paek, N.-C. (2007). The senescence-induced Staygreen protein regulates chlorophyll degradation. Plant Cell. 19: 1649-1664.

Entwicklungsabhängige Blattseneszenz

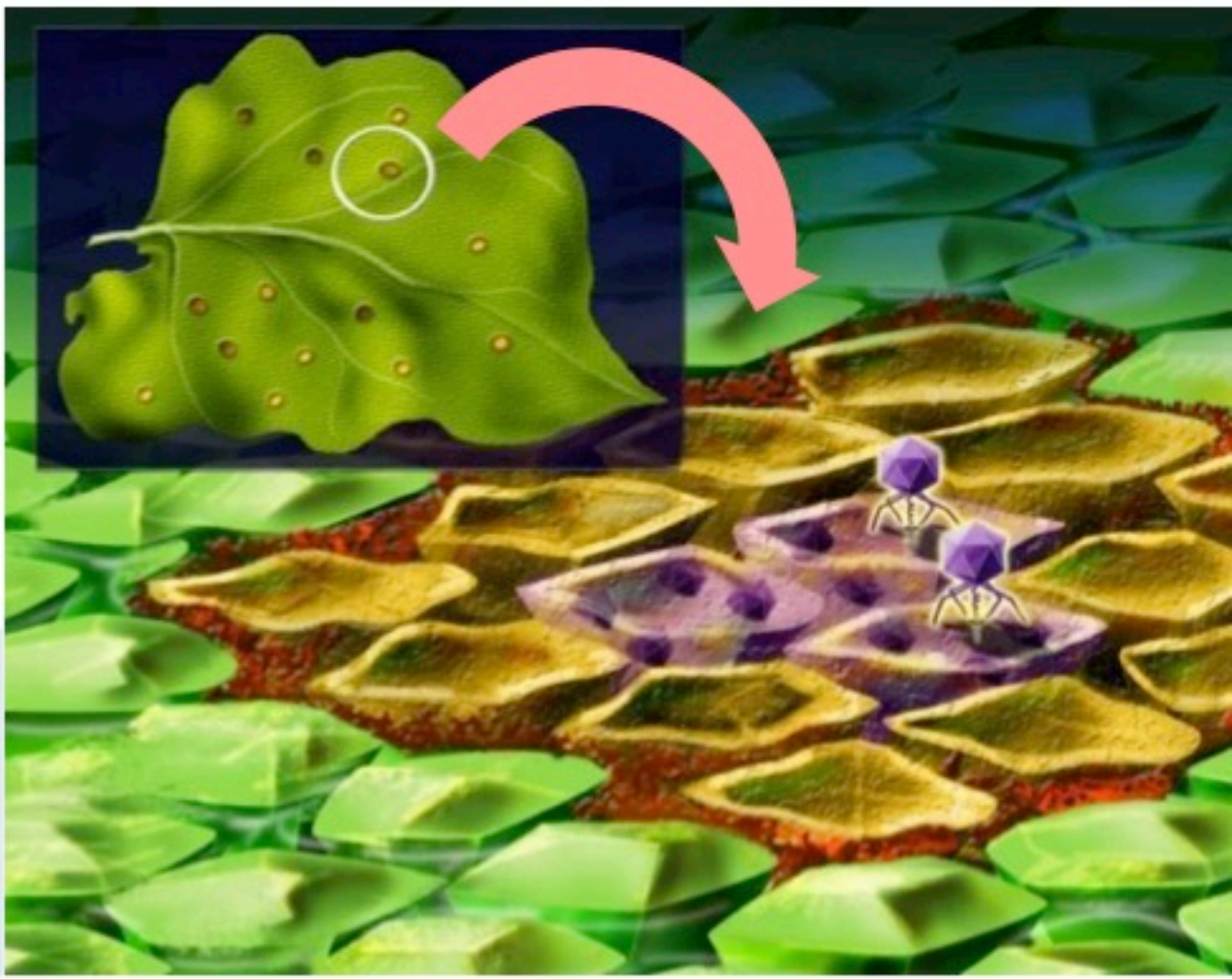
In ***monocarpischen*** Pflanzen löst die Reproduktion die Seneszenz aus .
Monocarpische Pflanzen blühen einmal, bilden Samen und sterben.
Die meisten Getreide sind monokarpisch.



Scott Bauer; Park, S.-Y., er al. (2007). The senescence-induced Staygreen protein regulates chlorophyll degradation. Plant Cell. 19: 1649-1664; Stan Shebs

Zelltod in Pflanzen - PCD als Verteidigungsmechanismus

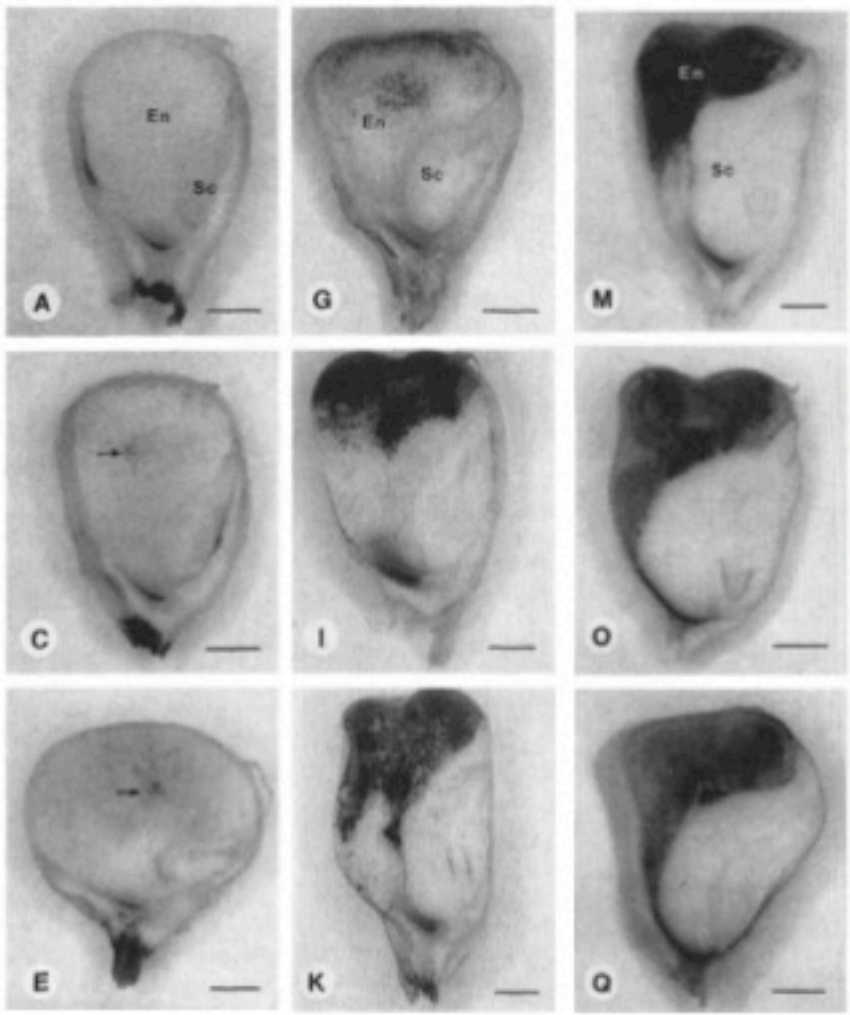
Die **hypersensitive Antwort** (hypersensitive response HR) ist ein, wenn nicht der wichtigste Verteidigungsmechanismus der Pflanzen. Infizierte Zellen und deren Nachbarnzellen werden getötet.

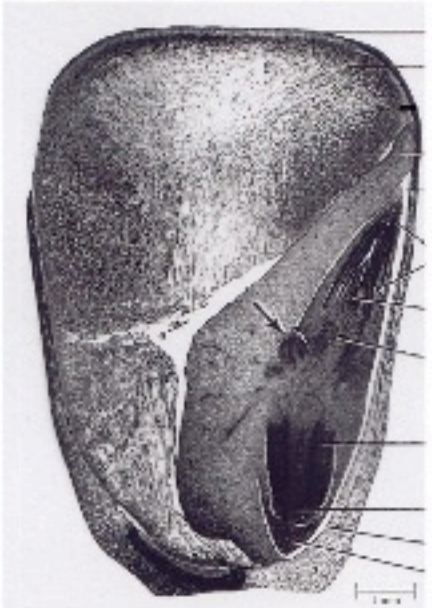


Lam, E. (2004) Controlled cell death, plant survival and development. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5: 305 – 315. Image credit: *Nicolle Rager Fuller, National Science Foundation*

Zelltod in Pflanzen - PCD bei der Kornentwicklung von Mais

Evans Blue-Färbung von toten Zellen (➔ VL Keimlingsentwicklung)

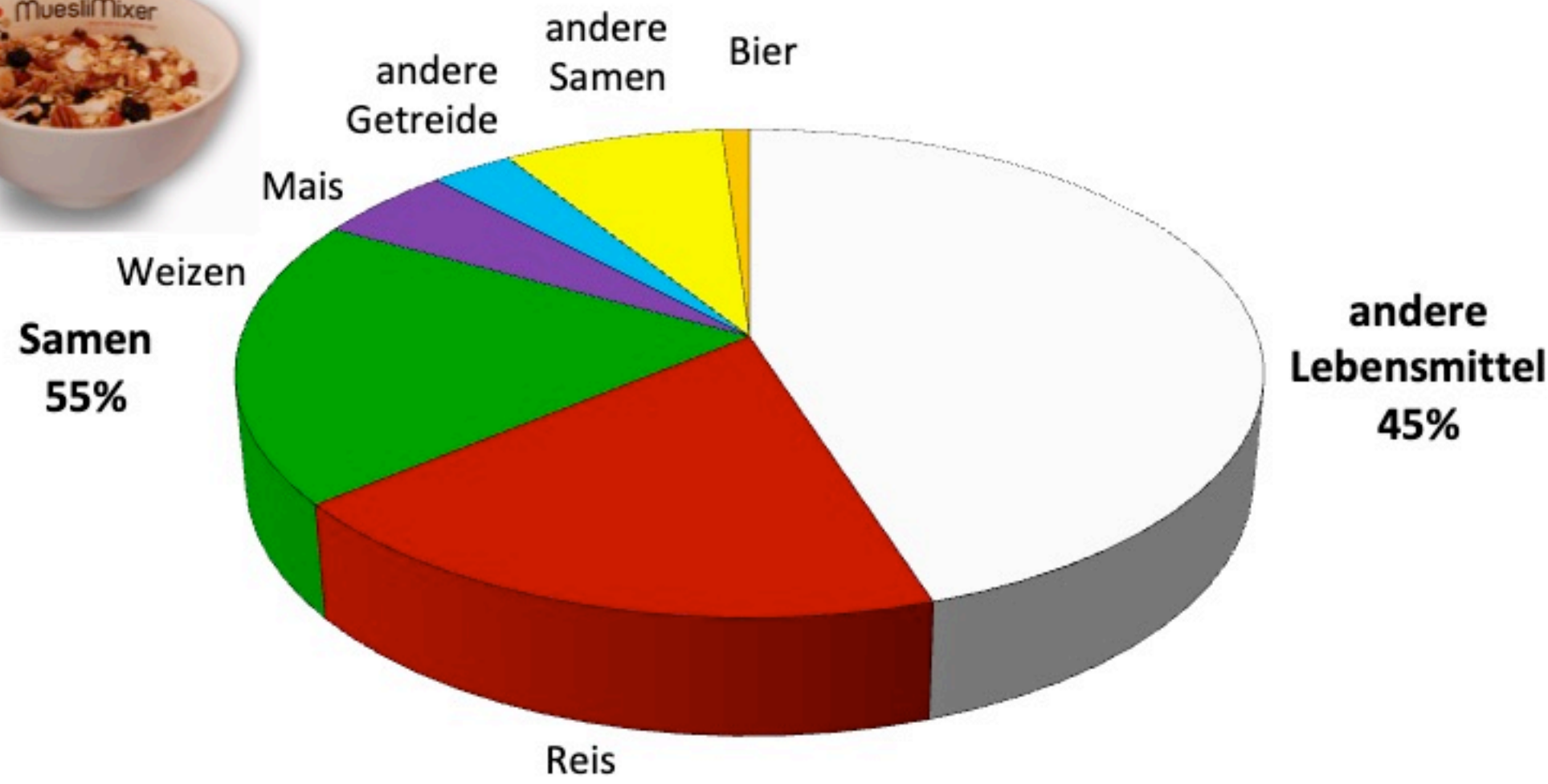




* am oberen Ende des Mesocotyls: Lage der Wurzelinitiale für sekundäre Wurzel

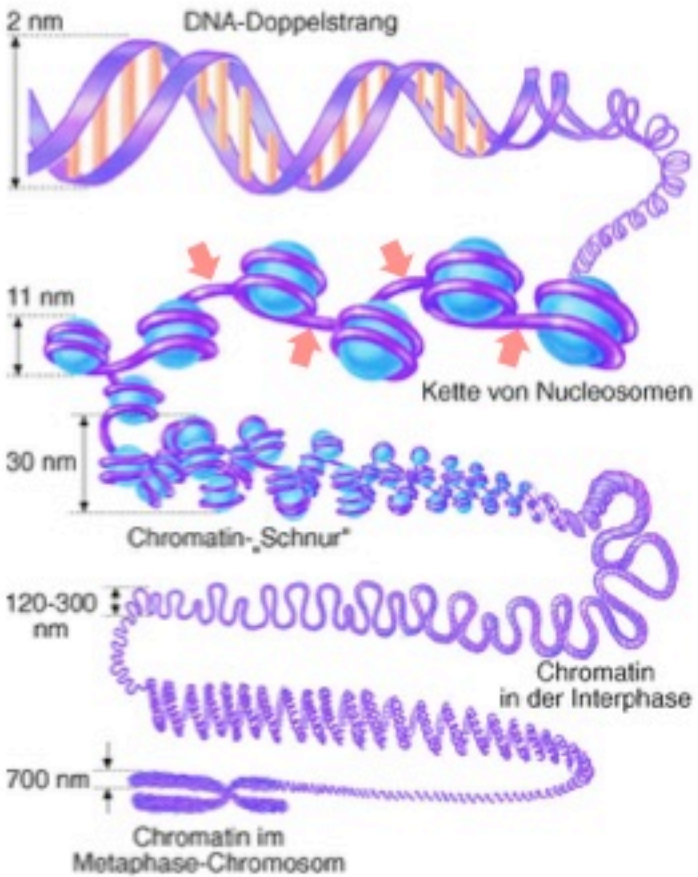
Young et al. Plant Physiol. (1997)

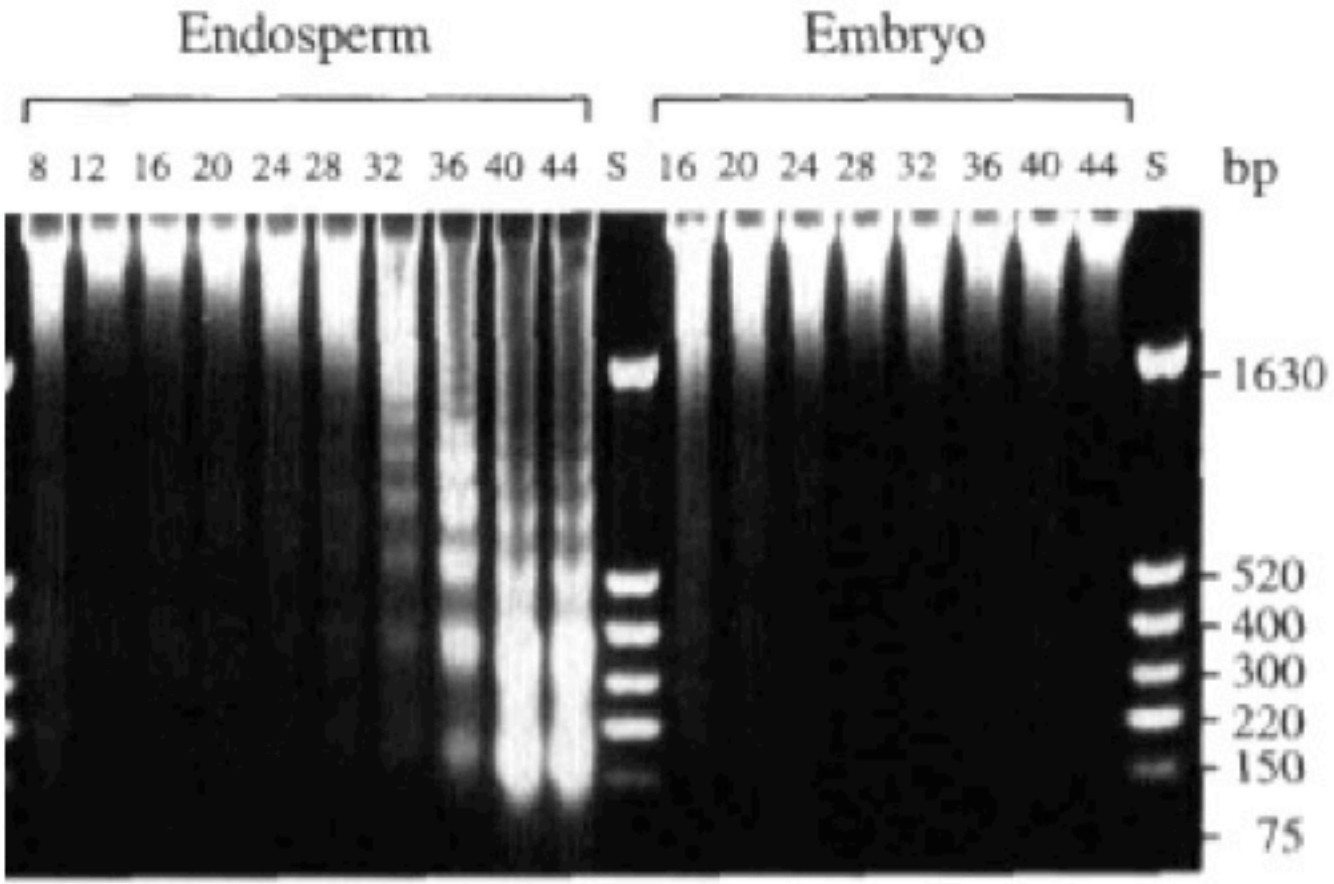
Getreidesamen sind die Hauptnahrungsquelle der Menschen



Quelle: FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
http://faostat.fao.org

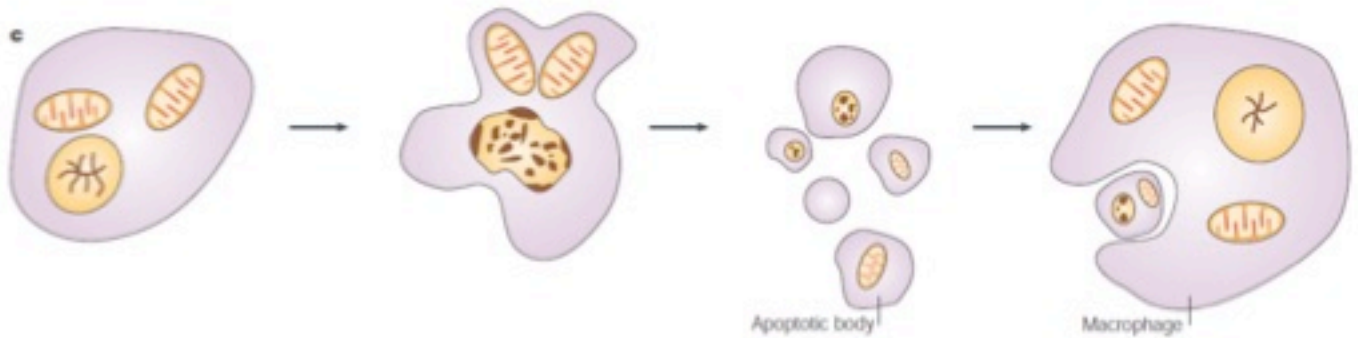
DNA laddering im Endosperm von Mais



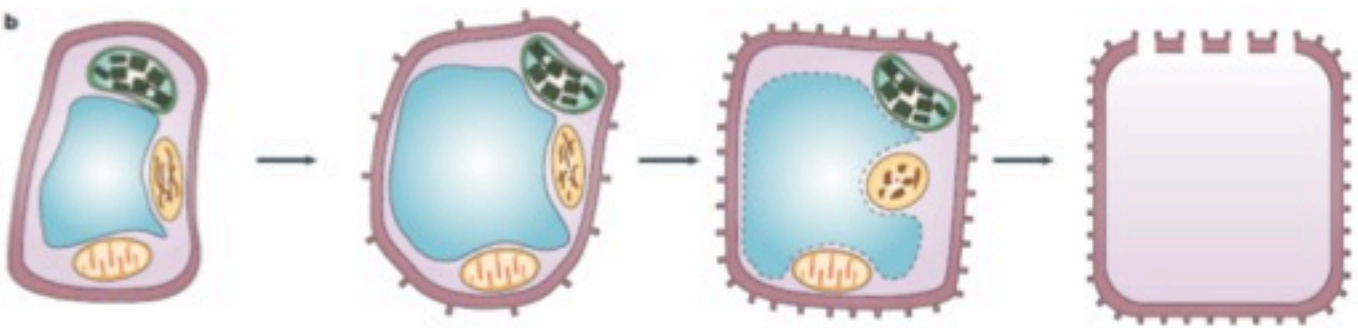


ABER: PCD ist unterschiedlich zwischen Pflanzen und Tieren

Apoptose in Tieren



PCD während der Tracheenentwicklung



Lam 2004

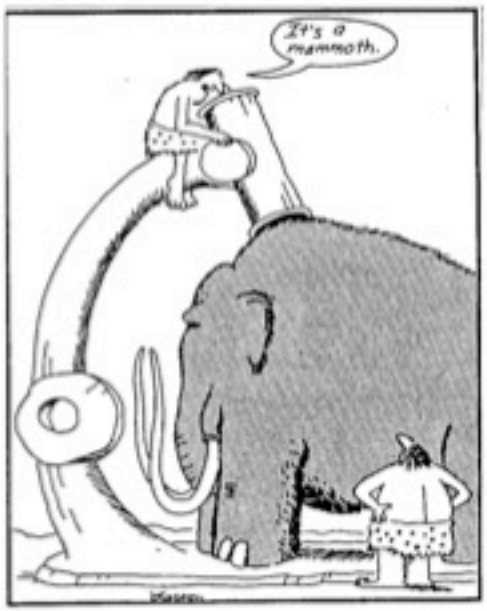
Pflanzen:

- **Keine Caspasen oder Homologe der Bcl2-Familie**
- **Keine Phagozytose**
- **Zellwand, d.h. PCD und Ausräumen der Zellreste muss zellautonom geschehen**

Herausforderung bei der Untersuchung von Zelltodprozessen in Pflanzen

Herausforderung bei der Untersuchung von PCD in Pflanzen…

- Zellmorphologie und Veränderungen bei PCD anders als in Tieren
- Molekulare Regulatoren („upstream“) sowie auch die Exekutionsmaschinerie weitgehend unbekannt
- uneinheitliche Nomenklatur, z.B. Seneszenz, hypersensitive Antwort (HR), Zelltod

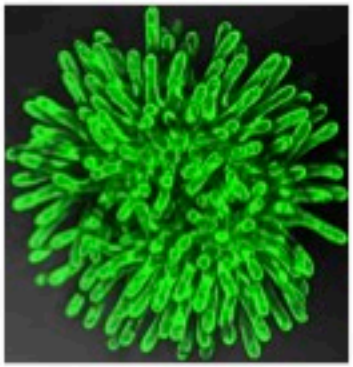


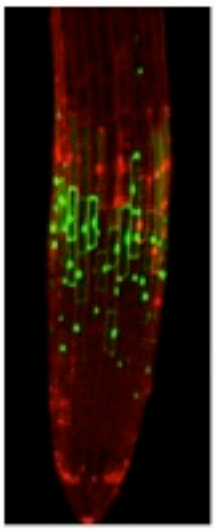
… notwendige Schritte:

- sensitive Detektionsmethoden, vor allem auch Lebendbeobachtungen
- molekulare Zugänglichkeit
- Verwerfen von Dogmen
- **PCD Modellsysteme**

2 Vorzeigeprojekte

Absterben der Papillazellen





Zelltod in der Wurzelhaube

Beispiele und Daten von Prof. Dr. Moritz Nowack
VIB und Universität Gent, Belgien

VIB http://www.psb.ugent.be/programmed-cell-death Plant Systems Biology

Unbefruchtete Blüten haben eine festgelegte Lebensspanne

Orchidee

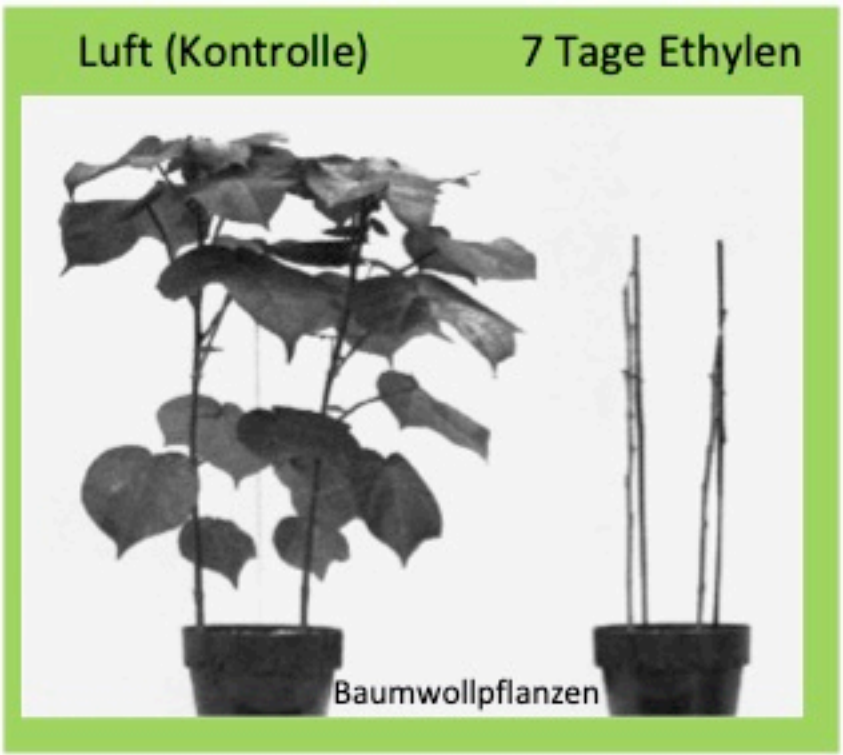
empfänglich für Monate

Königin der Nacht (*Selenicereus grandiflorus*)

empfänglich für Stunden

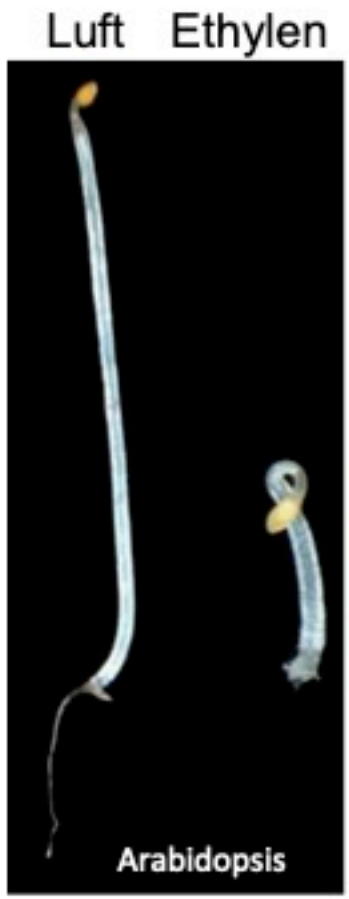
- nicht-befruchtete Blüten haben eine **artabhängige Lebensdauer**
- das **reproduktive Potential** einer Pflanze hängt von der Lebensdauer der Fortpflanzungsorgane ab
- Lebensdauer der Blüte ist ein **wichtiges adaptives Merkmal**
- interessantes **Züchtungsziel** um den Ertrag zu steigern

Das Pflanzenhormon Ethylen spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Seneszenz



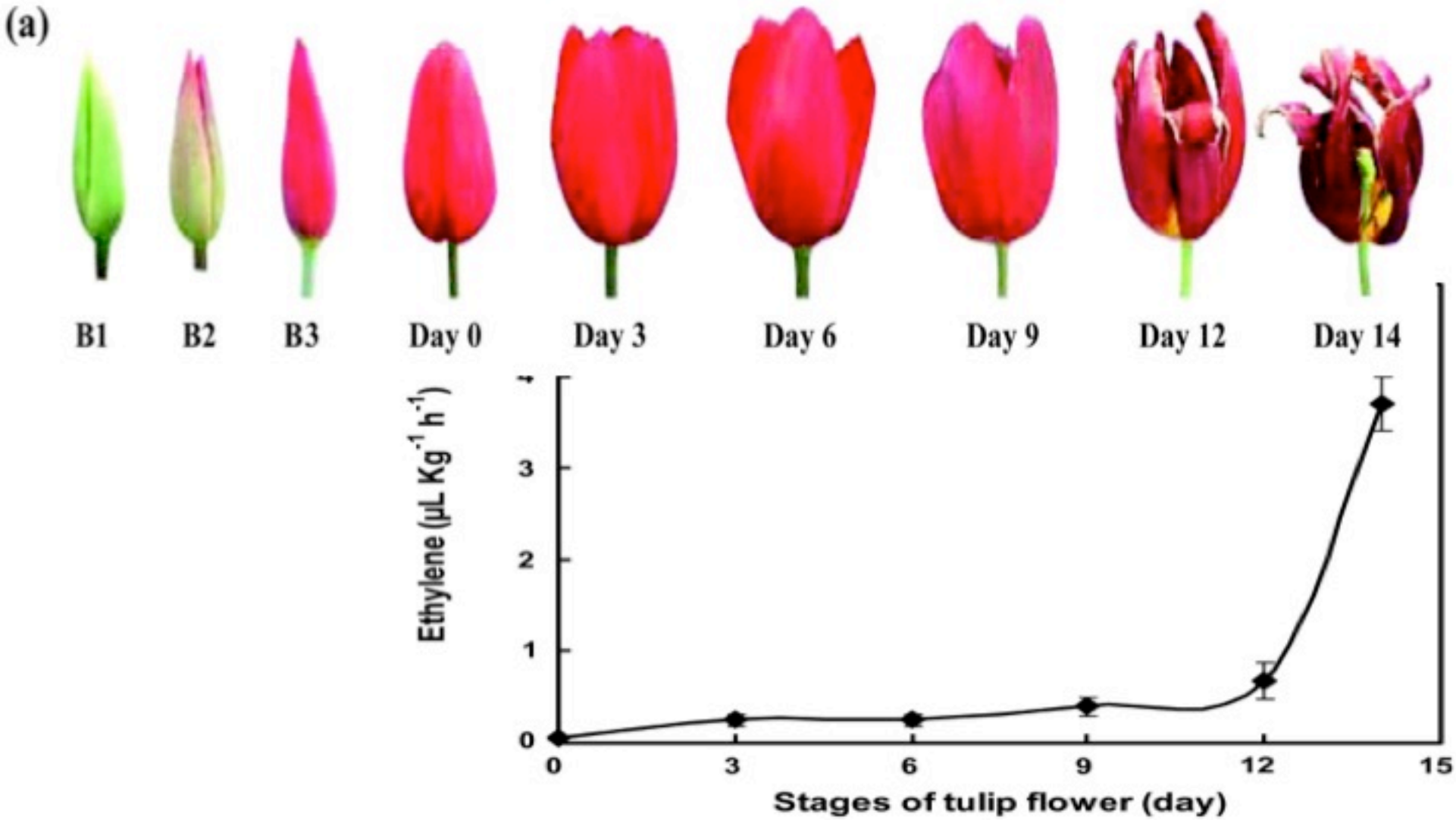
Ethylen (C_2H_4) reguliert:

- Reifung der Frucht
- Organ-Streckungswachstum
- **Seneszenz**
- Genexpression
- Stressantwort



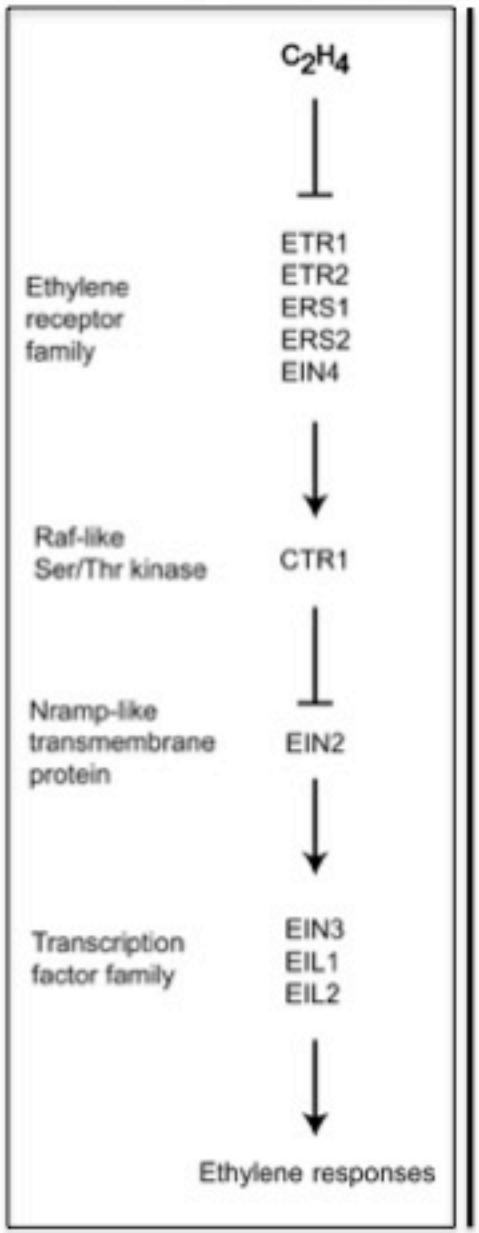
Beyer, Jr., E.M. (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol. 58: 268-271.

Ethylen fördert die Seneszenz von Petalen



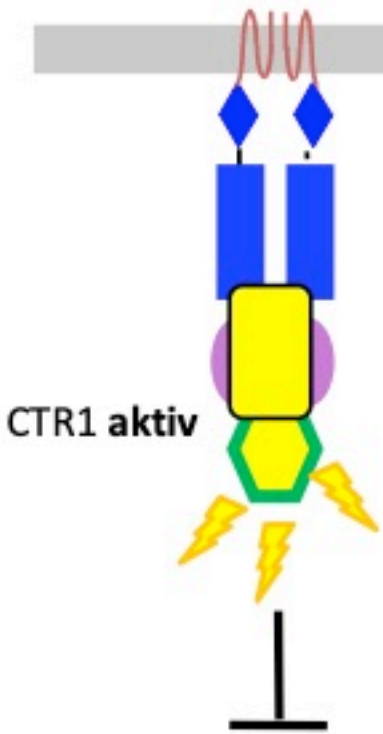
Azad, A.K., Ishikawa, T., Ishikawa, T., Sawa, Y., and Shibata, H. (2008). Intracellular energy depletion triggers programmed cell death during petal senescence in tulip. J. Exp. Bot. 59: 2085-2095, by permission of Oxford University Press.

Ethylensignaltransduktionsweg – doppeltnegative Regulation

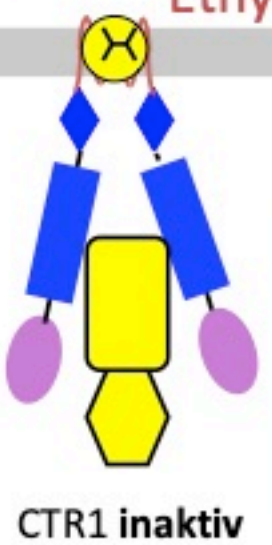


➔ VL Pflanzenphysiologie, Prof. Hoth

Ethylen



Ethylen



In der **Abwesenheit** von Ethylen ist **CTR1 aktiv** und inhibiert die Ethylen-Antwort

In der **Anwesenheit** von Ethylen wird **CTR1 inaktiviert**.

Antwort AUS

Antwort AN

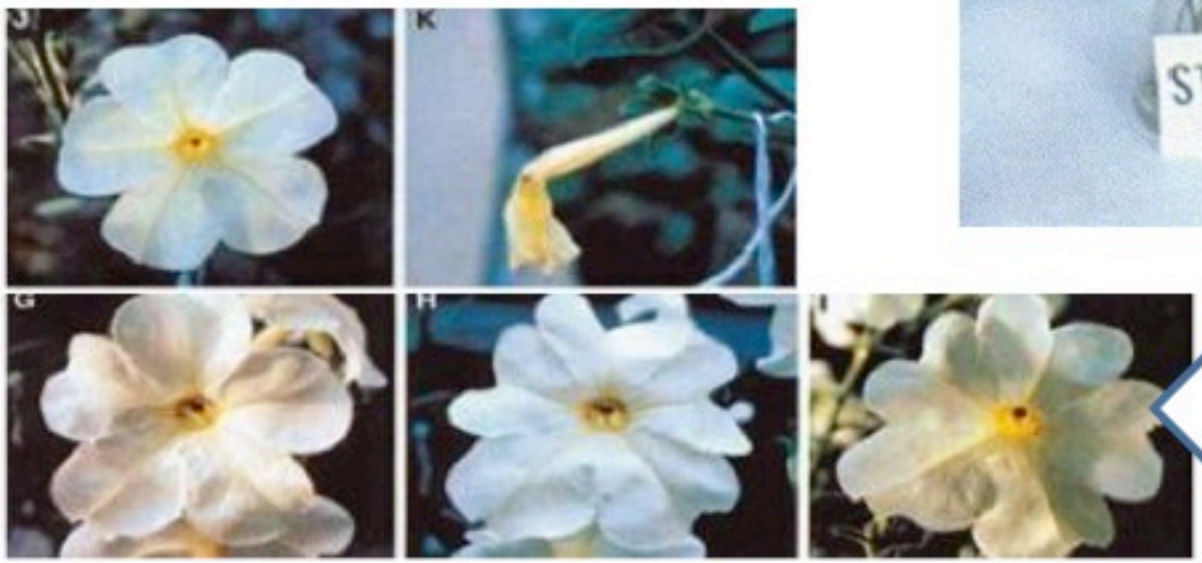
from Kendrick, M.D., and Chang, C. (2008). Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. Curr. Opin. Plant Biol. 11: 479-485

Modulation des Ethylensignalweges verlängert die Lebensdauer von Petalen

STS* und DACP** interferieren mit der Bindung von Ethylen an seinen Rezeptor

Wild-type

etr1-1



0 **3** **8**

Tage nach der Pollinierung

Expression von einem *etr1-1* mutanten Allel unterdrückt die das Absterben von Petalen nach Ethylengabe

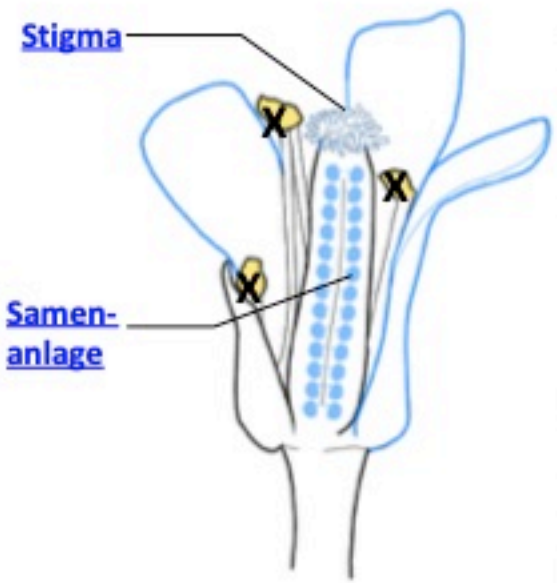
*STS = Silberthiosulfat

**DACP = Diazocyclopentadiene

from Serek, M., Woltering, E.J., Sisler, E.C., Frello, S., and Sriskandarajah, S. (2006) Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. Biotech. Adv. 24: 368-381; Wilkinson, J.Q., Lanahan, M.B., Clark, D.G., Bleecker, A.B., Chang, C., Meyerowitz, E.M., and Klee, H.J. (1997). A dominant mutant receptor from Arabidopsis confers ethylene insensitivity in heterologous plants. Nat Biotech 15: 444-447.

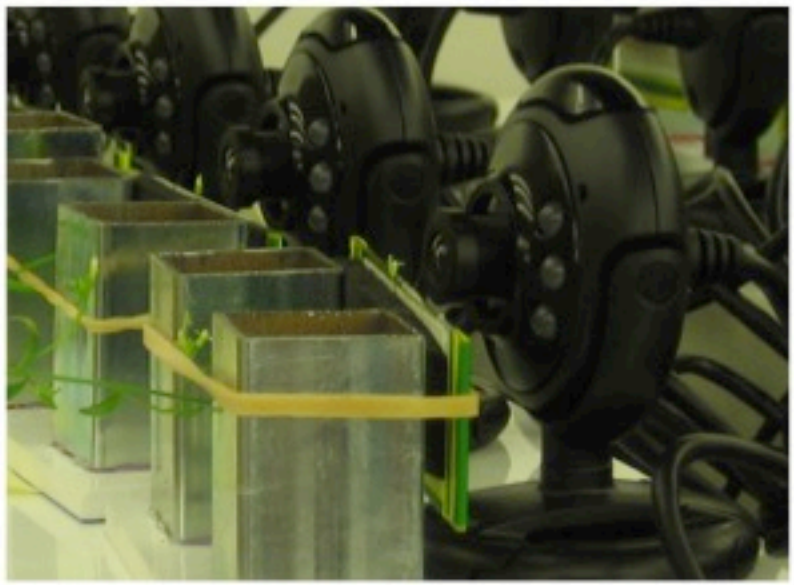
Zelltod in der Blüte – Absterben der Papillazellen in Arabidopsis als Modelsystem

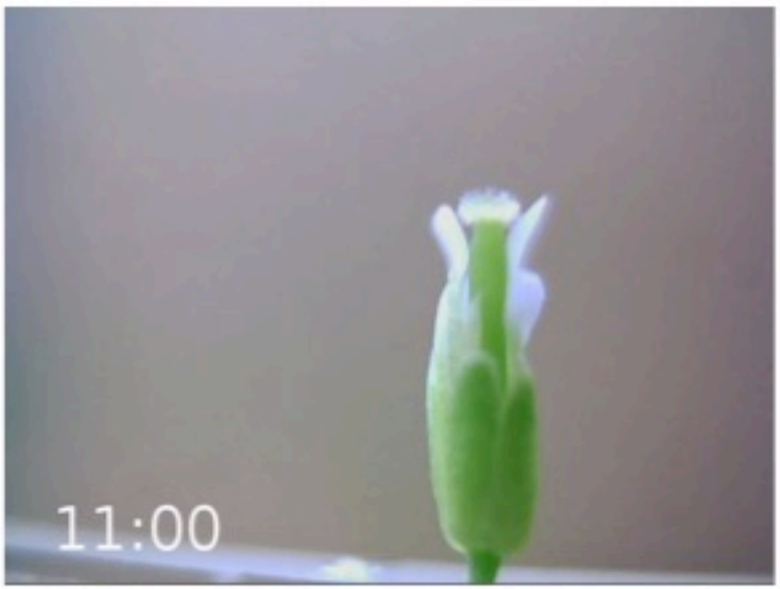
Daten von Moritz Nowack



- Focus auf **Stigma** (und **Samenanlagen**) von emaskulierten (Antheren entfernt) oder männlich-sterile Blüten
- **Schneller Kollaps** in einer **genau definierten Zeitspanne** von ca. 50h bei 12°C
- Das Stigma besteht aus **hunderten von Zellen**
- **Sehr gut zugänglich:**
  - morphologisch klar-definiertes Gewebe
  - an der Oberfäche, d.h. zugänglich für Chemikalien

Webcam Phänotypisierung...





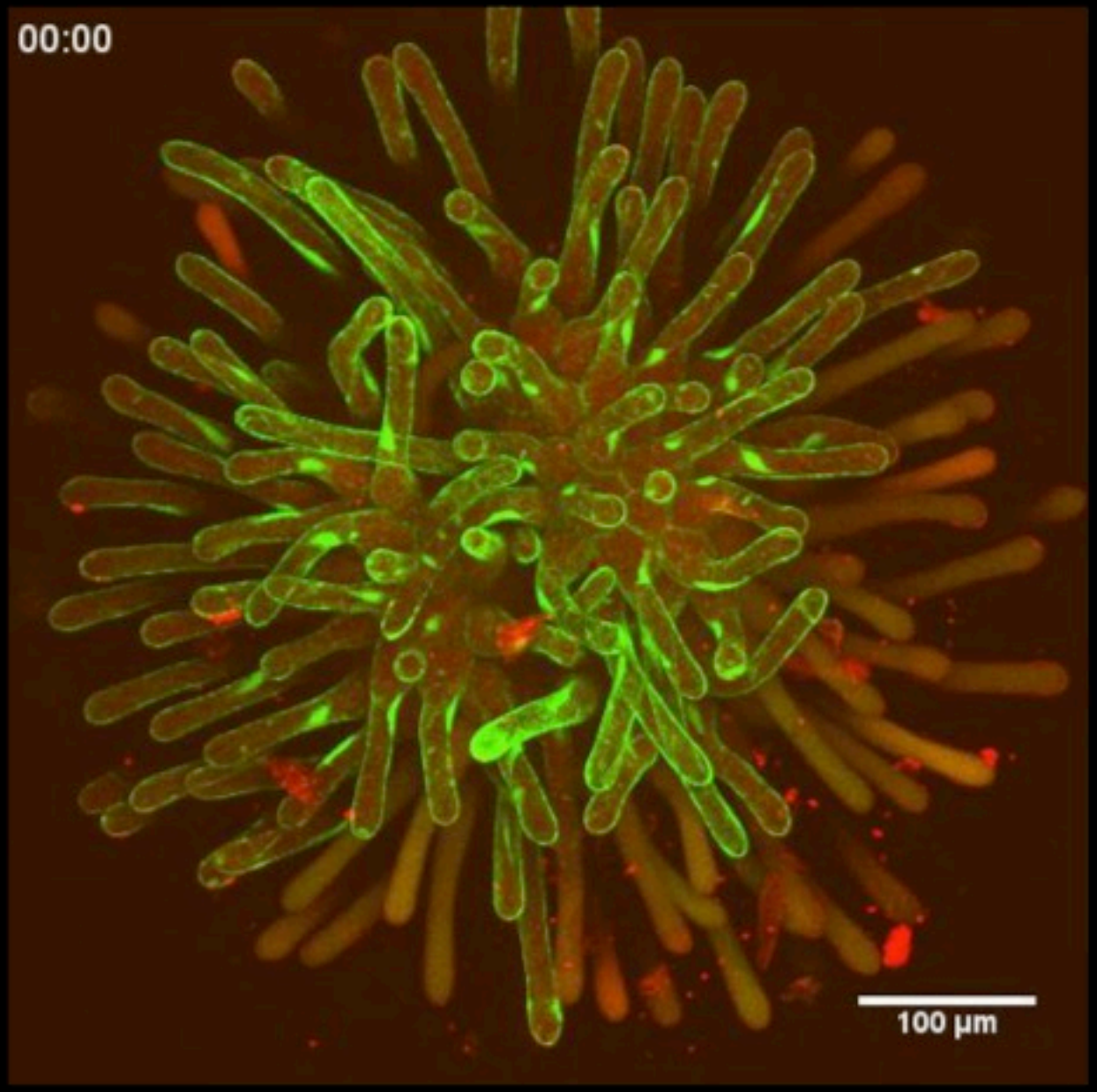
Papillazelltod ist schnell und suprazellulär-organisiert

Wasserimmersions-Objektiv

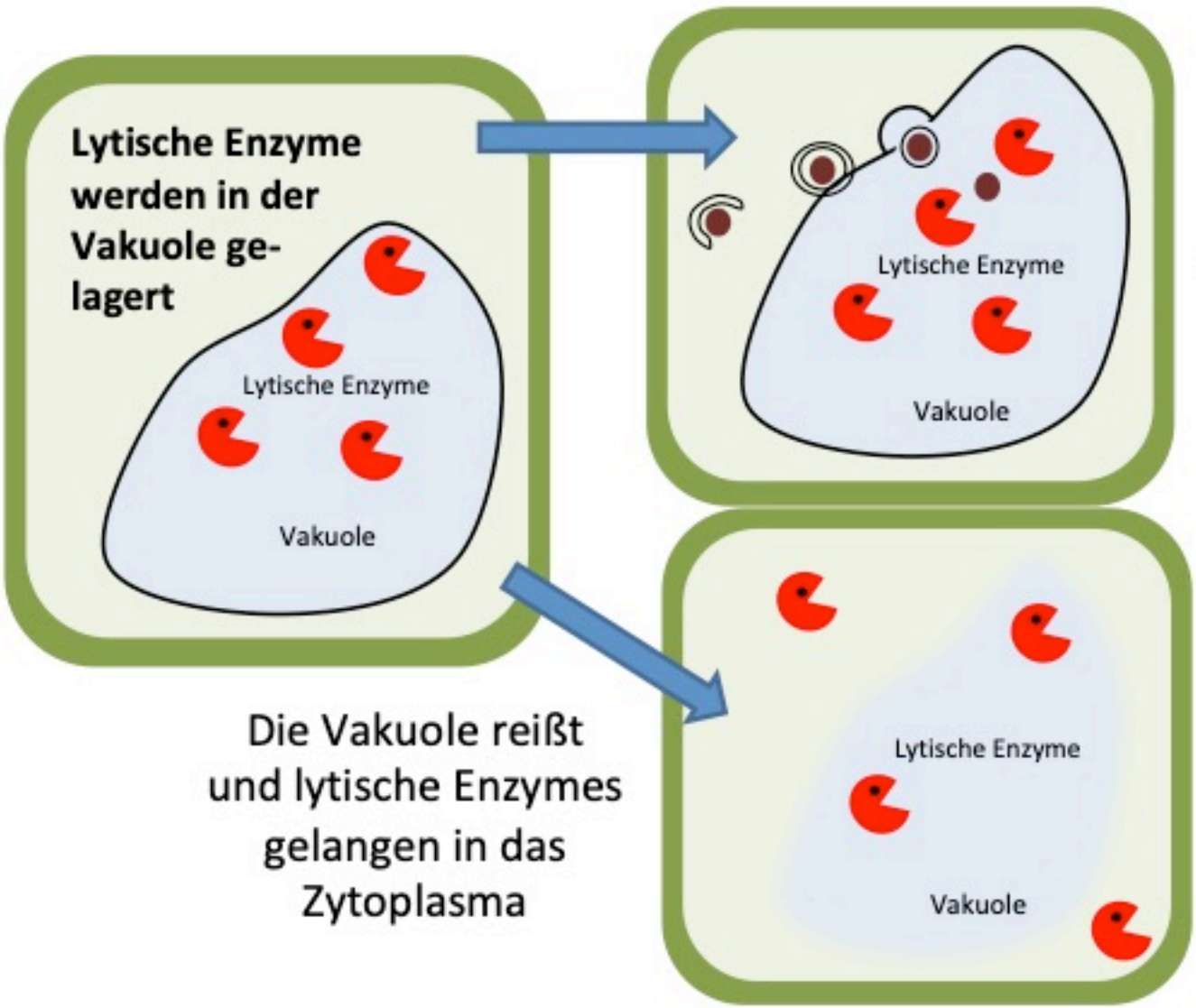
Tonoplasten-Integritätsmarker

- zytoplasmatisches GFP + vacuoläres RFP
- Vermischen bedeutet Zusammenbruch der Vakuole indicates

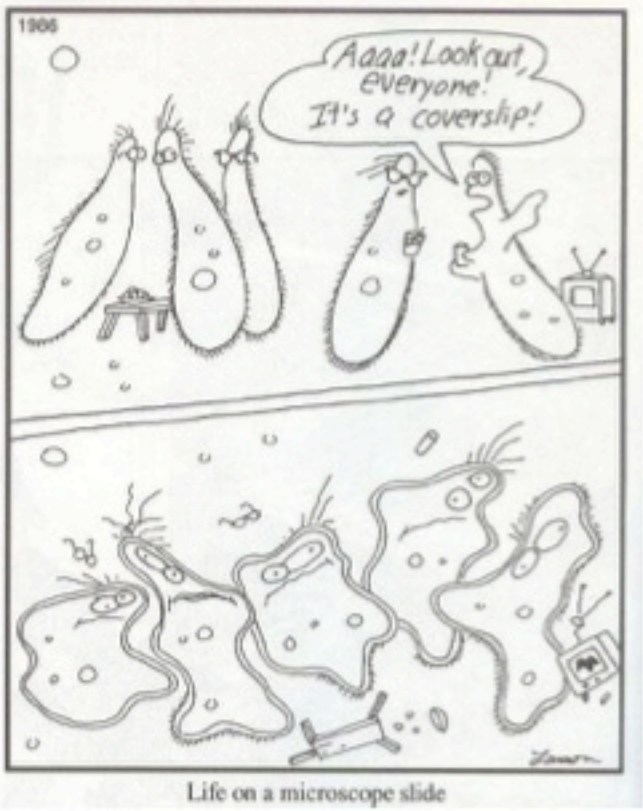
Gruppen von Papillazellen sterben



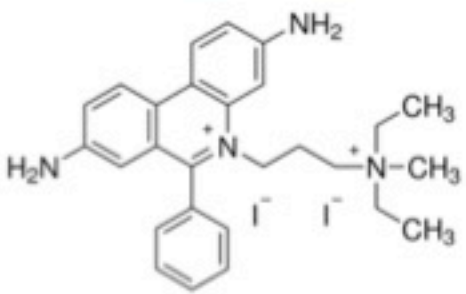
Die Vakuole spielt eine wichtige Rolle beim PCD in Pflanzen



PI und FDA – zwei sehr nützliche Farbstoffe



Life on a microscope slide

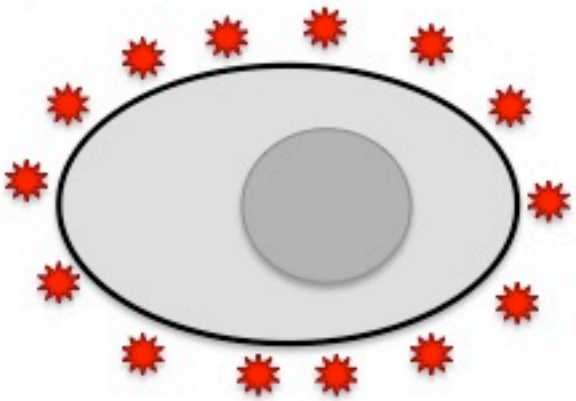


Propidium Iodid

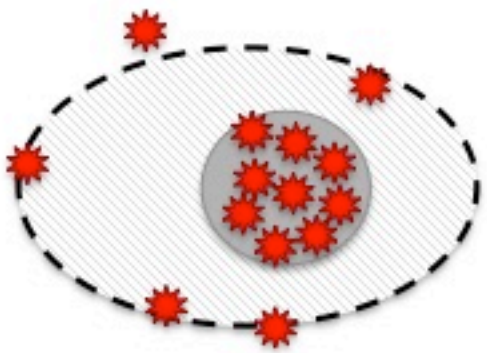
Propidium Iodid (PI)

- Propidium Iodid ist positiv geladen und färbt DNA an
- Durch die positive Ladung aber nicht membrangängig
- Tote Zellen verlieren die Integrität der Plasmamembran, PI kann nun eindringen
- Tote Zellen leuchten rot

lebend



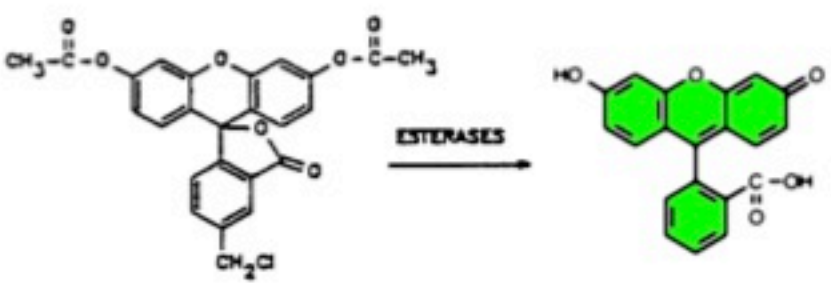
tot



PI und FDA – zwei sehr nützliche Farbstoffe

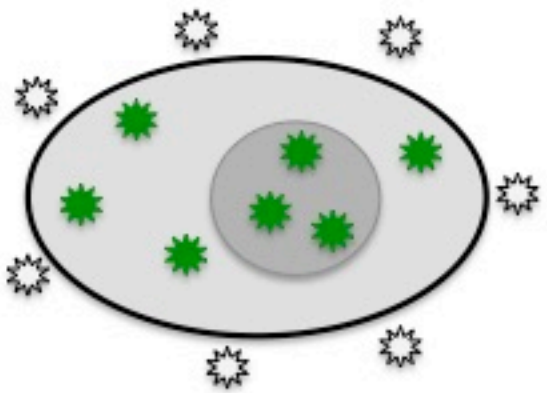
Fluorescein Diacetat (FDA)

- FDA ist membrangängig
- In einer lebenden Zelle wird FDA gespalten in Fluorescein und Essigsäure
- Fluorescein ist NICHT membrangängig und akkumuliert deshalb in lebenden Zellen
- lebende Zellen leuchten grün

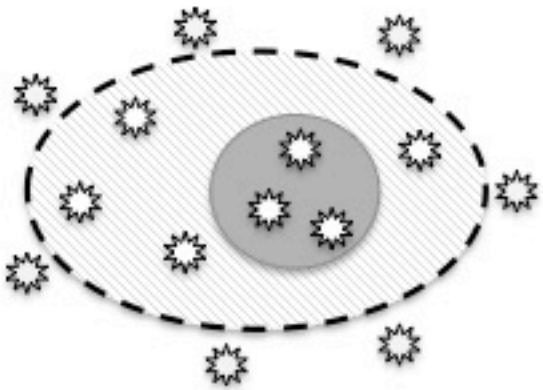


Fluorescin Diacetat

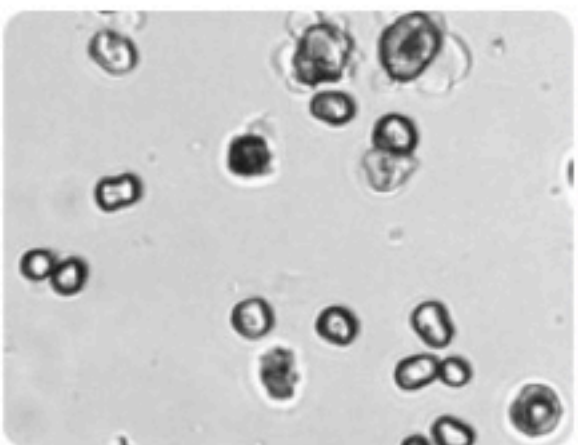
lebend



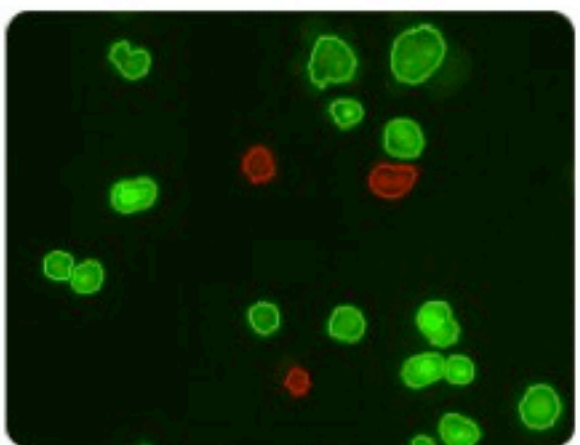
tot



Kombination von PI und FDA

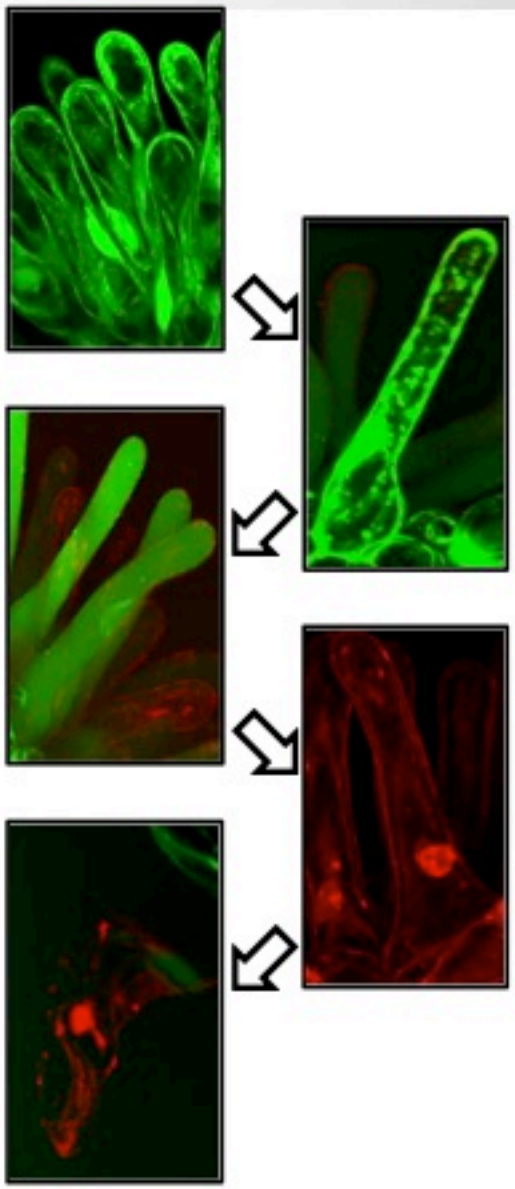


Hellfeld



Epifluoreszenz

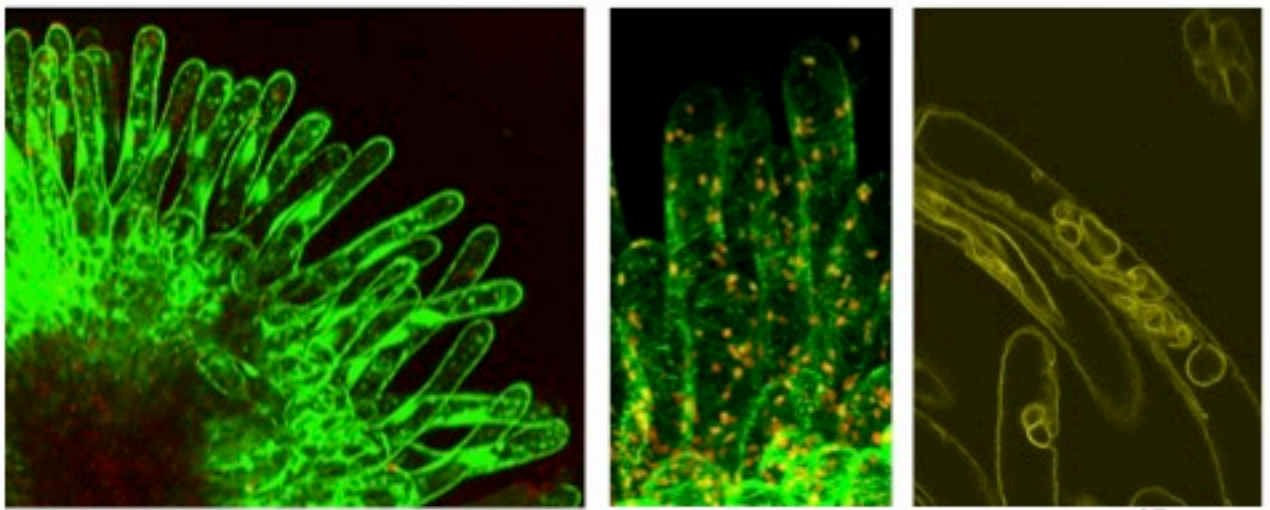
Papillazellen sterben in einem vakuolenabhängigen Prozess



PI + FDA Färbung

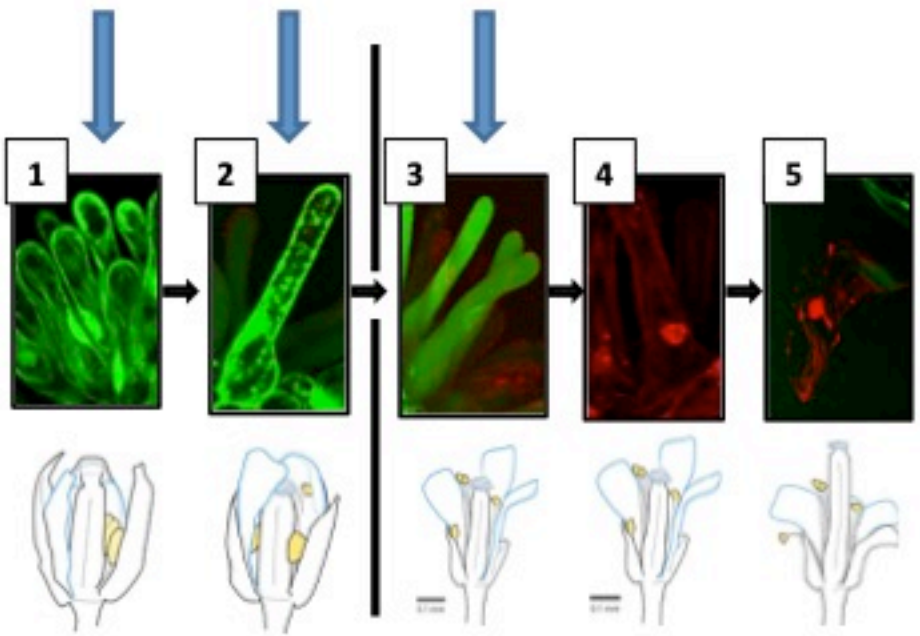
Genauer zeitlicher Verlauf der zellulären Ereignisse des Papillazellentodes:

- Zusammenbruch der Vakuole
- Auflösung der Plasmamembran
- Tod

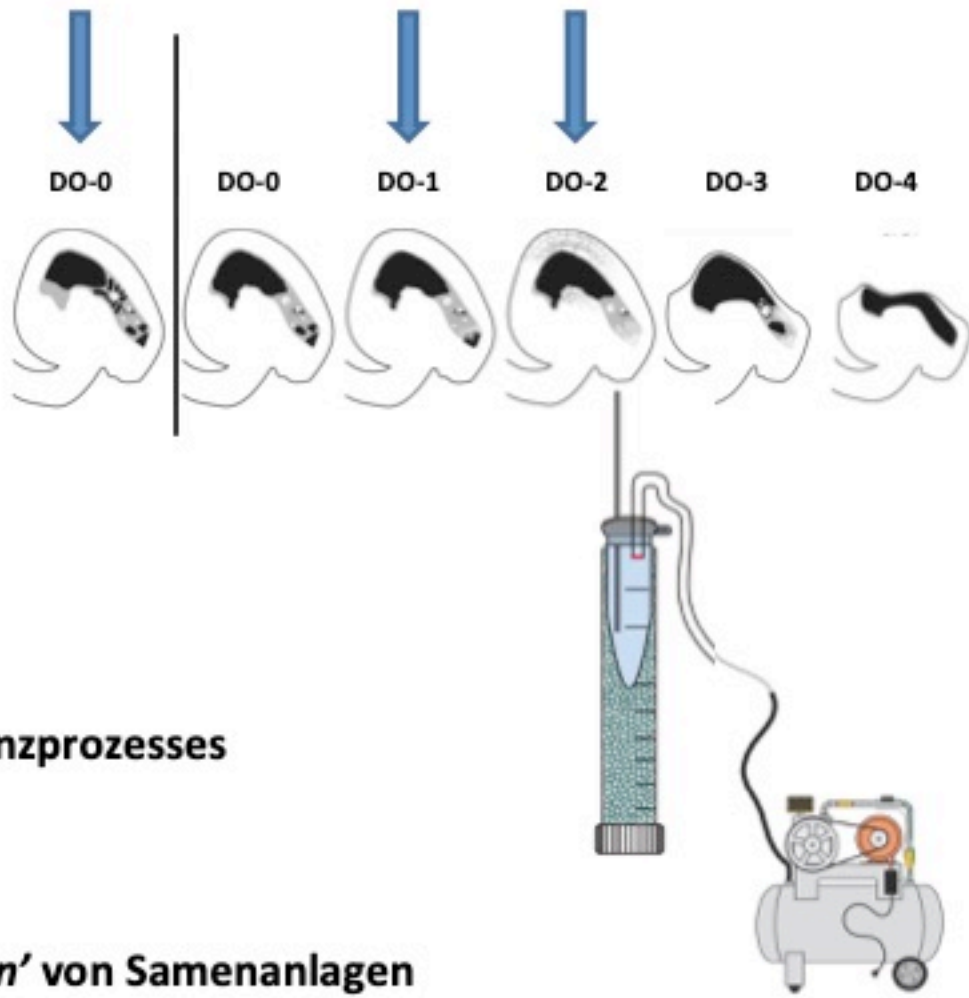


Transkriptionsprofiling von Papillazellen und seneszenten Samenanlagen

Papilla-Seneszenz *time course*



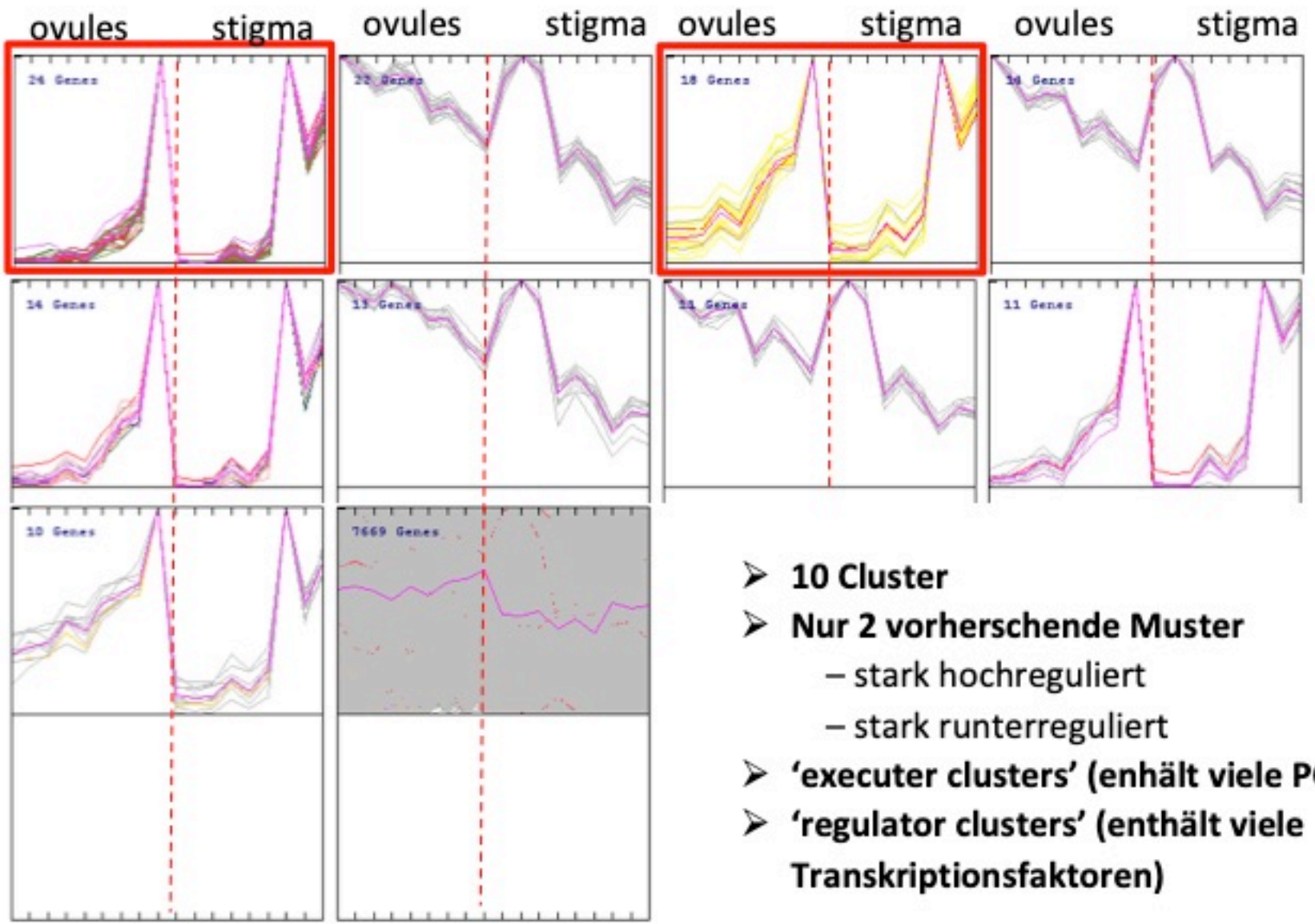
Samenanlagen-Seneszenz *time course*



- **Start und voranschreitende Stadien des Seneszenzprozesses**
- **3 Zeitpunkte, je 3 biologische Replikate**
- **händisch gesammelte Stigmata, *micro-dis'suction'* von Samenanlagen**

Methode: JP Vielle-Calzada

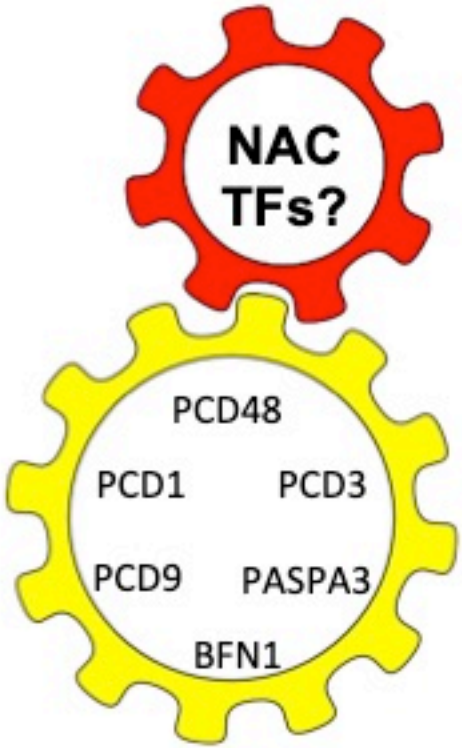
Clusteranalyse von Papillazellen und seneszenten Samenanlagen (Ovulen)



Qt cluster diameter 0,01, min 10 genes/cluster

- **10 Cluster**
- **Nur 2 vorherschende Muster**
  - stark hochreguliert
  - stark runterreguliert
- **'executer clusters' (enhält viele PCD Markers)**
- **'regulator clusters' (enthält viele Transkriptionsfaktoren)**

Kontrollieren NAC transkriptionsfaktoren den Zelltod in der Blüte?



ANAC-a	0 > 50
ANAC-b	7 > 70
ANAC-e	1 > 70
ANAC-f	0 > 20
ANAC-g	3 > 300
ANAC-k	10 > 50
ANAC-p	20 > 200
ANAC-q	20 > 250
ANAC-v	8 > 17
ANAC-w	30 > 800
ANAC-x	10 > 500
ANAC-y	3 > 80
ANAC-z	7 > 30

- **ABER: keine mutanten Phänotypen!**

Umwandlung eines transkriptionellen Aktivators in einen spezifischen Repressor

BD	Bindedomäne - binding domain
DM/ID	Dimerisierungsdomäne/Interaktionsdomäne
NLS	nuclear localisation signal - Kern Lokalisationssignal
AD	Aktivierungsdomäne - activation domain

Typische Bindedomänen

Helix turn Helix
Helix Loop Helix; b HLH
Zink Finger
Homeobox

Dimerisierungsdomäne

Leucin Zipper

Aktivierungsdomäne

„Sauer“ geladene Region (Aspatat, Glutamat), Prolin-reich

Umwandlung eines transkriptionellen Aktivators in einen spezifischen Repressor

BD	Bindedomäne - binding domain
DM/ID	Dimerisierungsdomäne/Interaktionsdomäne
NLS	nuclear localisation signal - Kern Lokalisationssignal
AD	Aktivierungsdomäne - activation domain

Typische Bindedomänen

Helix turn Helix
Helix Loop Helix; b HLH
Zink Finger
Homeobox

Dimerisierungsdomäne

Leucin Zipper

Aktivierungsdomäne

„Saure" geladene Region (Aspatat, Glutamat), Prolin-reich

Umwandlung eines transkriptionellen Aktivators in einen spezifischen Repressor

Repressordomänen in Tieren: z.B.:

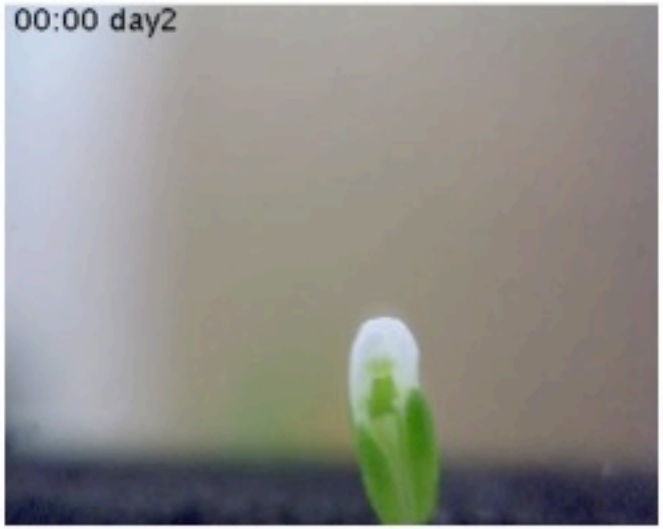
- Repressordomäne der **Krüppel-associated box** (**KRAB**) des humanen Estrogen-Rezeptors
- **Engrailed** (**En**) Repressor aus *Drosophila*
- **mSIN3** Interaktionsdomäne (**Sid**) aus dem Menschen

Repressordomänen in Pflanzen: z.B.:

- basierend auf der Repressordomäne des class II **ETHYLENE-RESPONSIVE ELEMENT-BINDING FACTOR** (**ERF**): EAR (ERF-associated amphiphilic repression) Motif z.B. auch in SUPERMAN (SUP) vorhanden
- **modifizierte EAR-Domäne**, kürzer und auf Repression optimiert: **SRDX** (LDLDLELRLGFA)

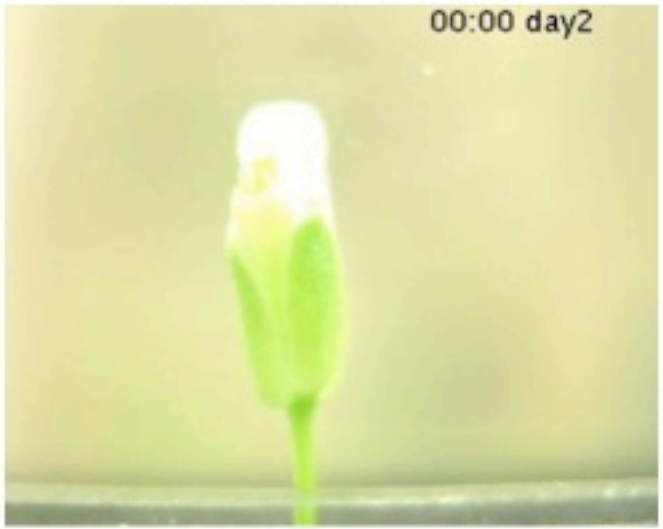
Test: ANAC092-SRDX Mutanten zeigen einen verspäteten Zelltod

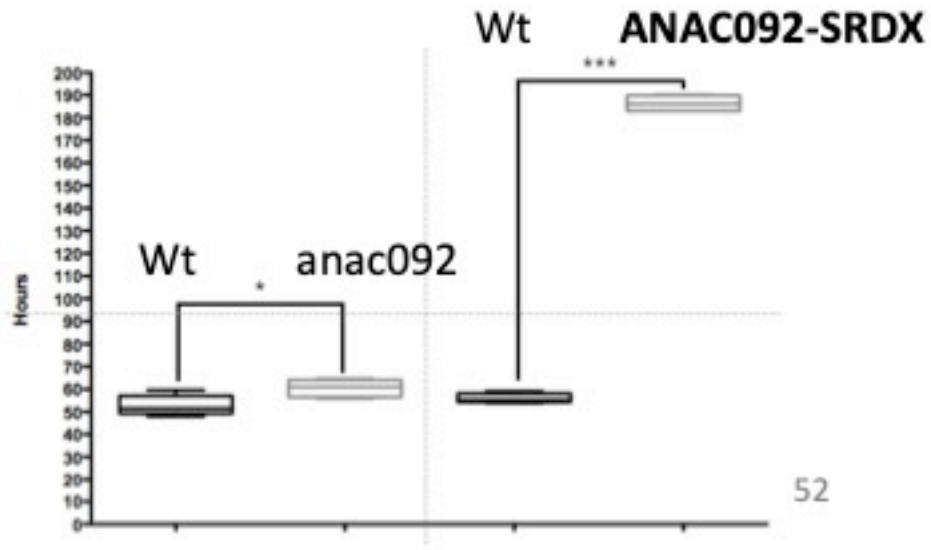
Wildtype Kontrolle



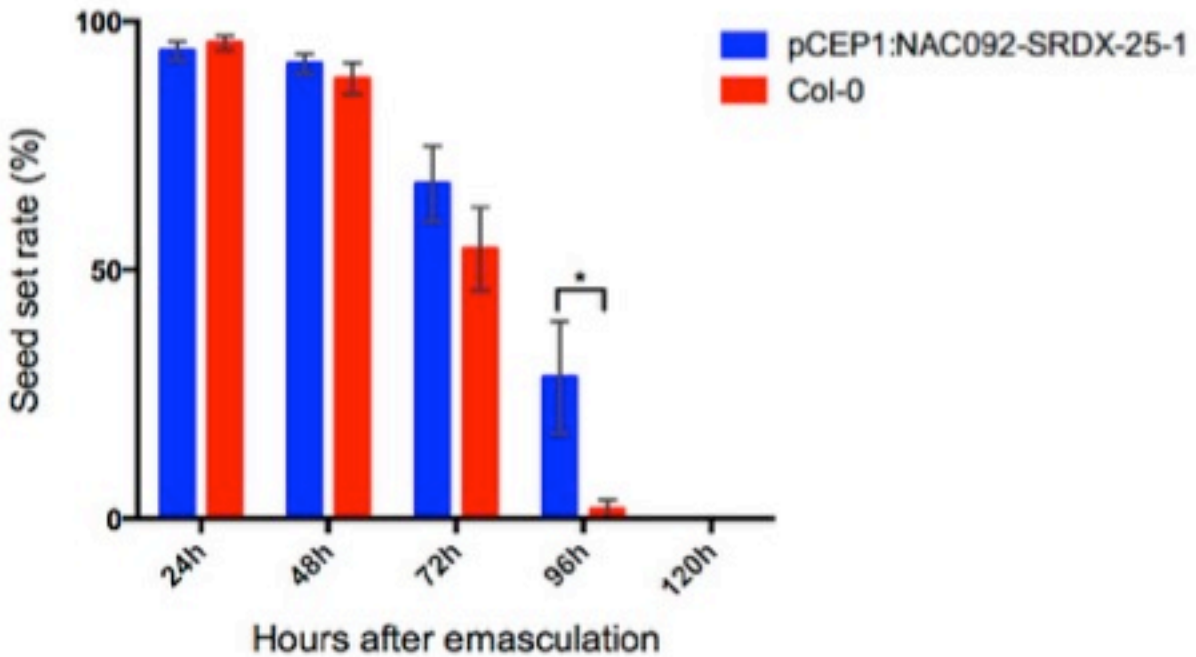
pCEP1:ANAC092-SRDX

anac092 Mutante





ANAC092-SRDX Mutanten zeigen eine längere Empfänglichkeitsdauer



- pCEP1:NAC092-SRDX Pflanzen sind nach über 96h immer noch empfänglich
- Die Lebensphase von Papillazellen kann sogar 200h erreichen, aber Befruchtungsrate bleibt nicht so lange erhalten
- Papillazellen immer noch funktional?
- Ist das Alter der Samenanlagen jetzt limitierend?

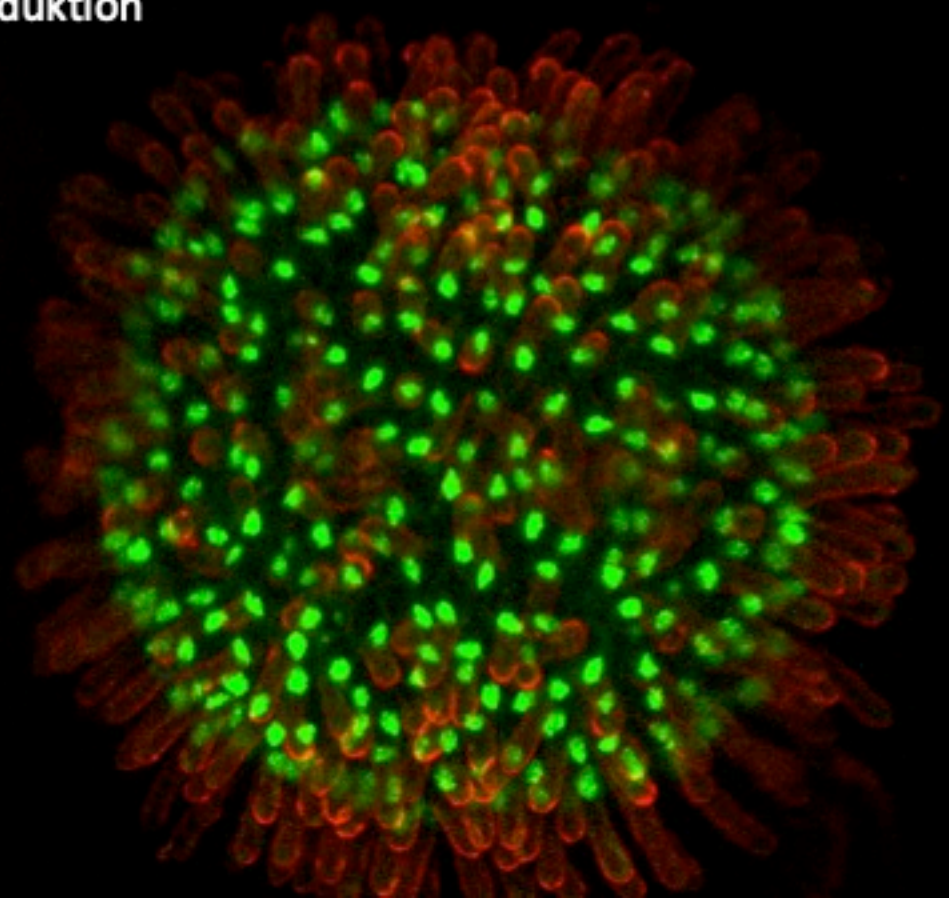
zukünftige Experimente

Papillazellen als Modellsystem zur Untersuchung von Zelltod und Seneszenz

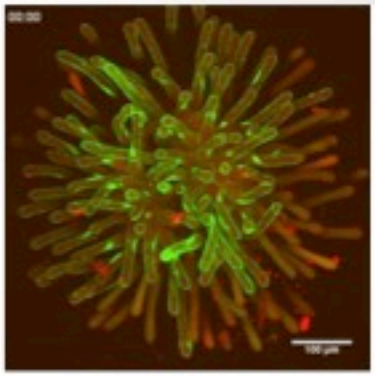
- Gewebe-spezifische Miss/Überexpression, z.B. um den Ethylensignaltransduktionsweg zu zerlegen:
  - PRO_{SLR1}>>RNAi-ETO1/2/3 → Ethylen Überproduktion
  - PRO_{SLR1}>>$etr1^{d}$ → Ethylen Insensivität

- Verhinderung von systemischen Effekten

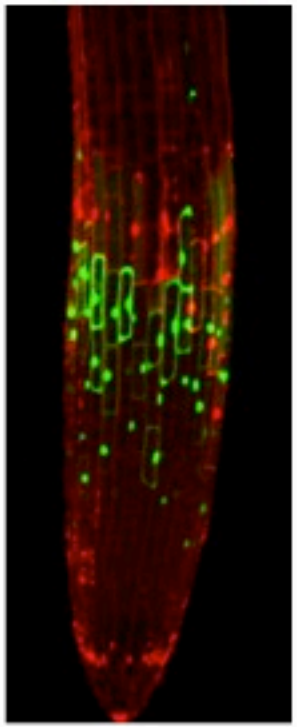
in Raum und Zeit



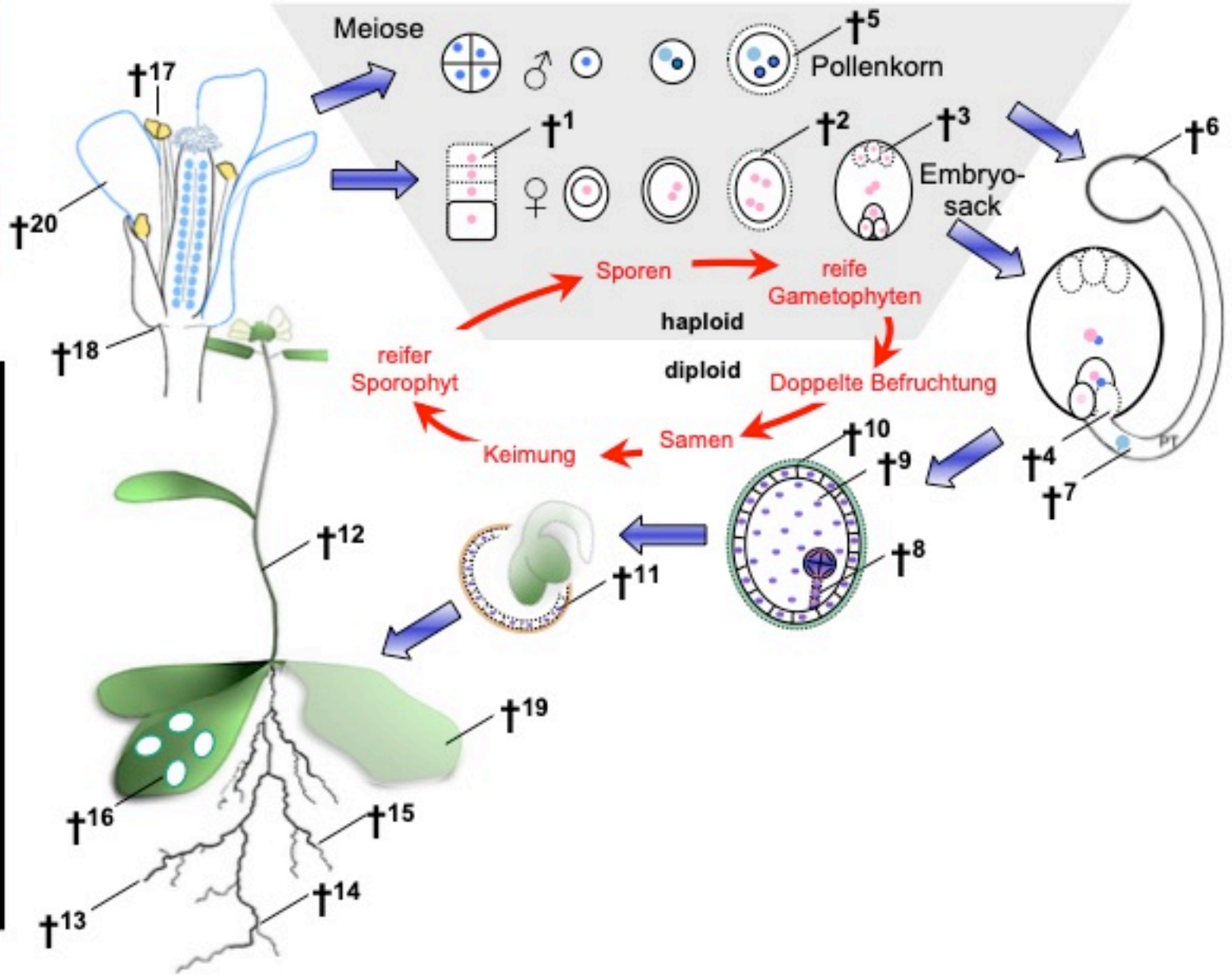
Modellsysteme zur Untersuchung von PCD



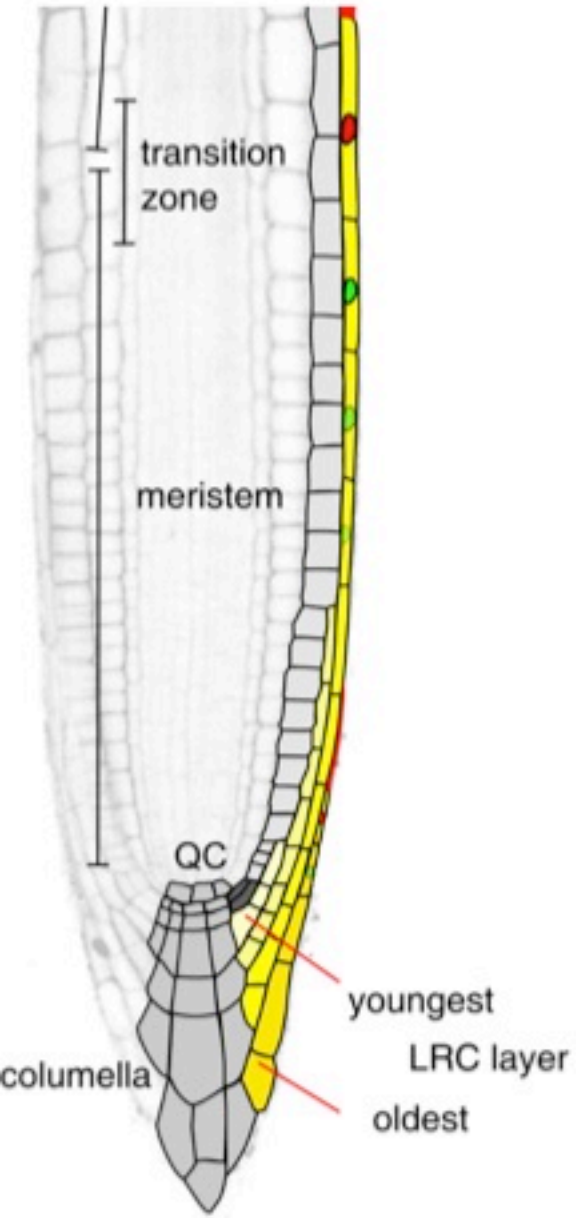
Papillazellen



Wurzelhaube



Die Wurzelhaube – ein besonderes Pflanzenorgan



Daten von Moritz Nowack

Die Wurzelhaube besteht aus zwei Geweben

- Die Columella (root cap)
- Die seitliche Wurzelhaube (lateral root cap LRC)
- Sowohl die Columella als auch die LCR bestehen mehrere Zellschichten

LRC Position und Größe bleiben ± konstant

- Im Gegensatz zur eigentlichen Wurzel, wird die LRC nicht grösser
- Die Wurzelhaube bleibt an der Spitze einer wachsenden Wurzel

LRC-Zellen werden ständig erneuert durch einen Ring von Stammzellen

- Wiederholte asymmetrische (formative) Zellteilungen generieren neue LRC-Schichten
- LRC-Zellen teilen sich zuerst, expandieren dann und differentiieren
- ABER: Die Anzahl der LRC-Zellen wird nicht mehr

… wie gehen also LRC-Zellen verloren?

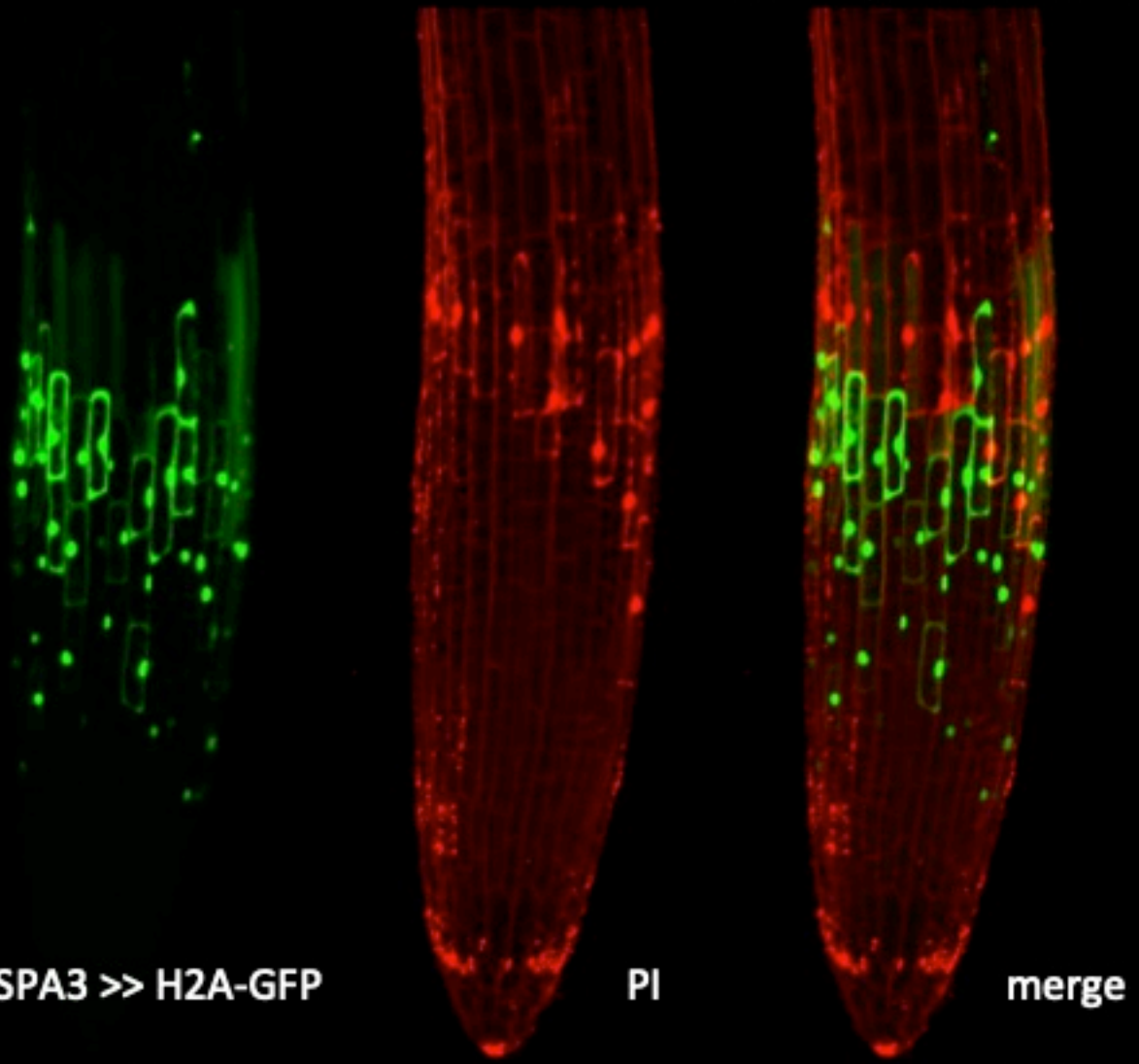
Unterläuft die LCR einen programmierten Zelltod?

Fendrych et al. Curr Biol 2014

Dogma im Pflenzenfeld:
Die seitliche Wurzelhaube wird "abgeschilfert".

Aber: die ältesten PASPA3*-exprimierenden Zellen werden von PI gefärbt

➔ Programmierter Zelltod?



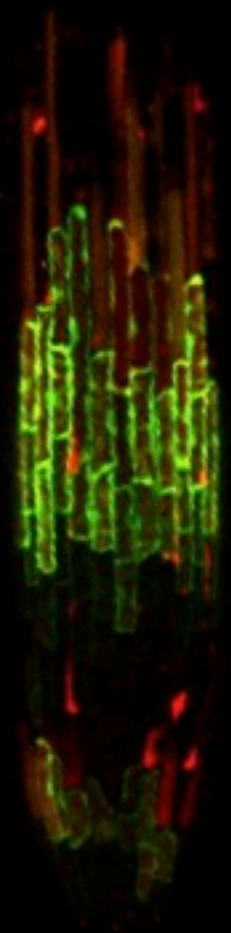
pPASPA3 >> H2A-GFP | PI | merge

*Pasp-A3: Protease, die als Phytepsins aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit zu Säugetierenzymen Pepsin and Cathepsin D bezeichnet wird.

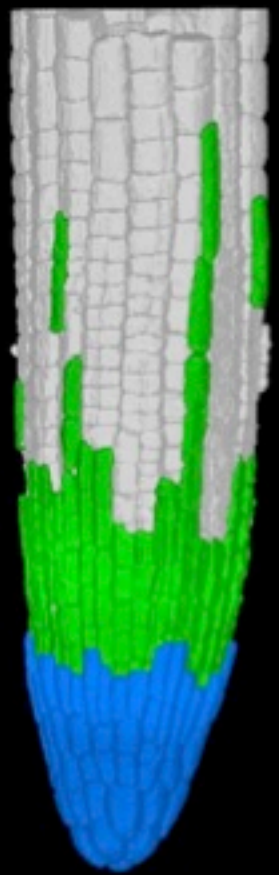
Vakuolärer Zelltod am Ende jeder LRC Schicht

de Reuille PB et al. Meth Mol Biol 2014

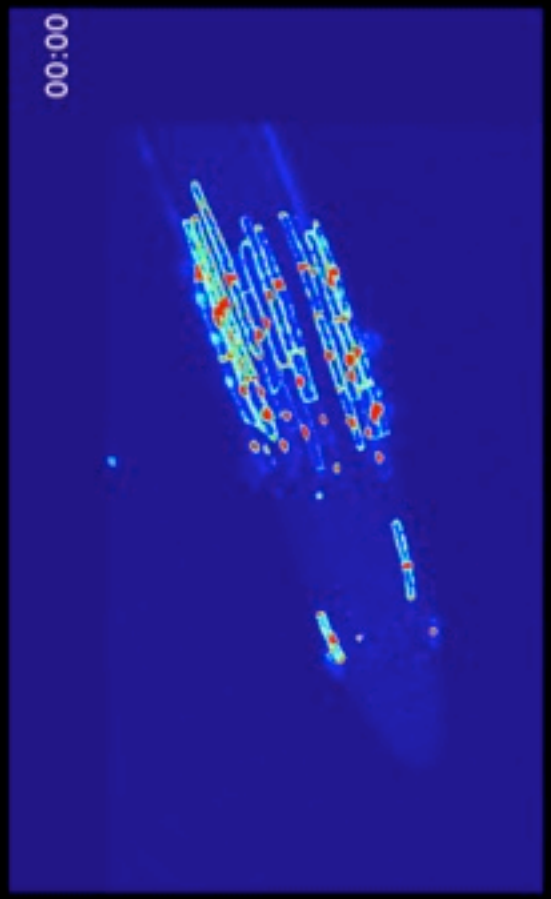
proPASPA3::cGFP-A2-vRFP



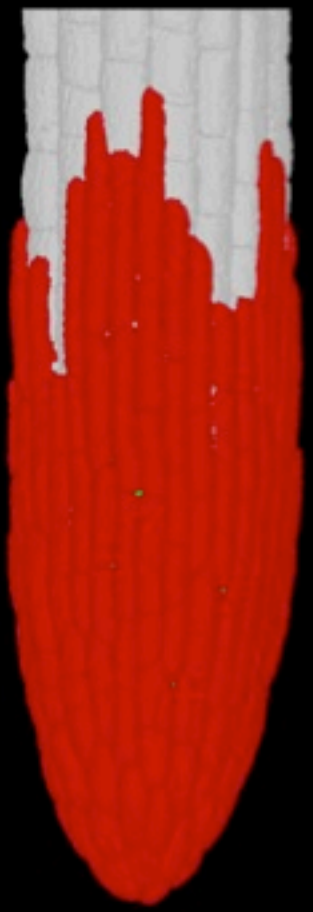
MorphoGraphX



pPASPA3>>GFP

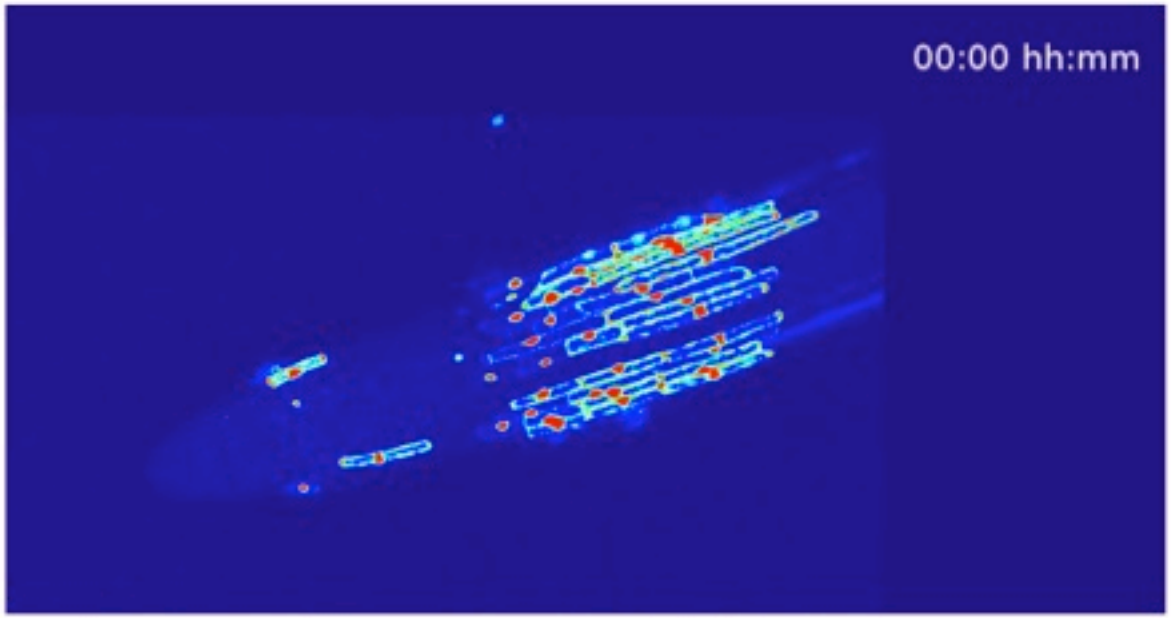


Iterativer Turnover der Wurzelhaubenschichten

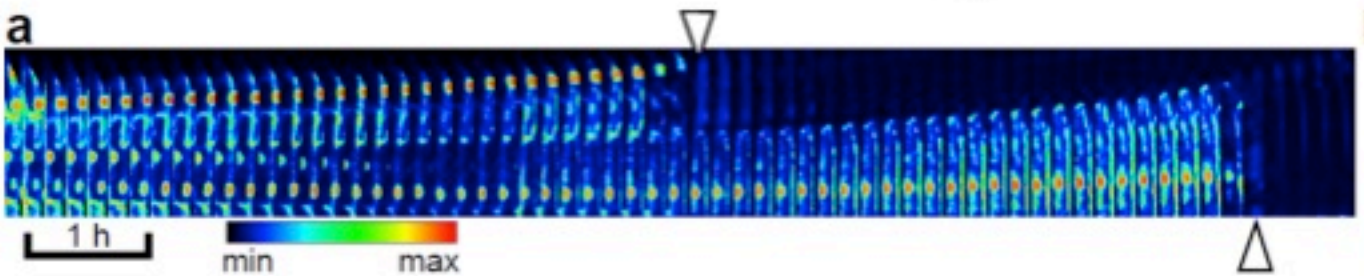


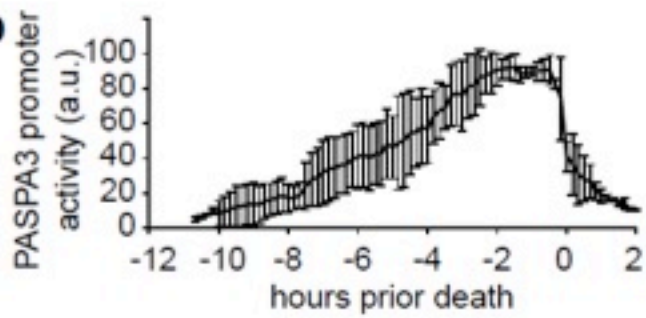
72h >>

Lebendbeobachtung des Zellsterbens



➔ **räumliche und zeitliche Analyse der Vorbereitung, Initiation und Ausführung des LCR Todes**

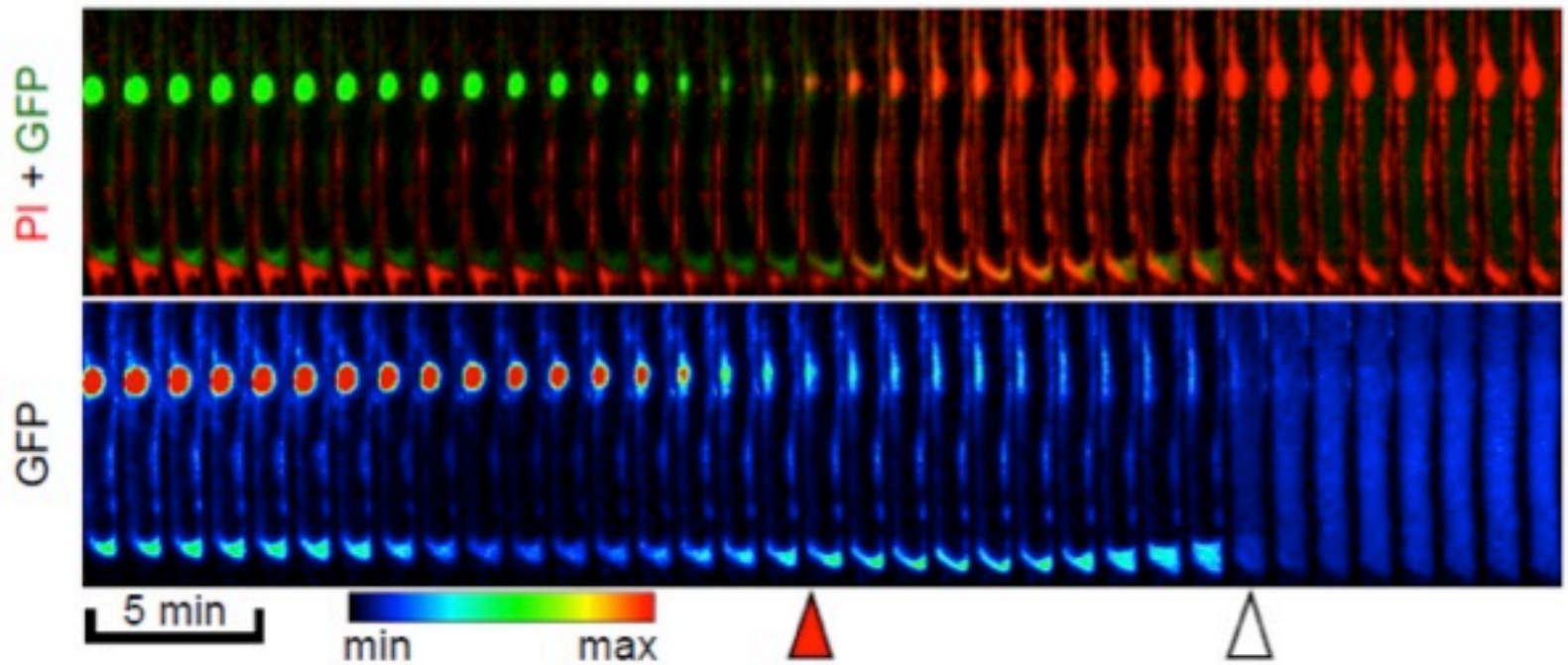




1. PRO_{PASPA3} Expression beginnt ~15h vor dem Zelltod

LCR Tod erfolgt in einer genau geregelten Abfolge

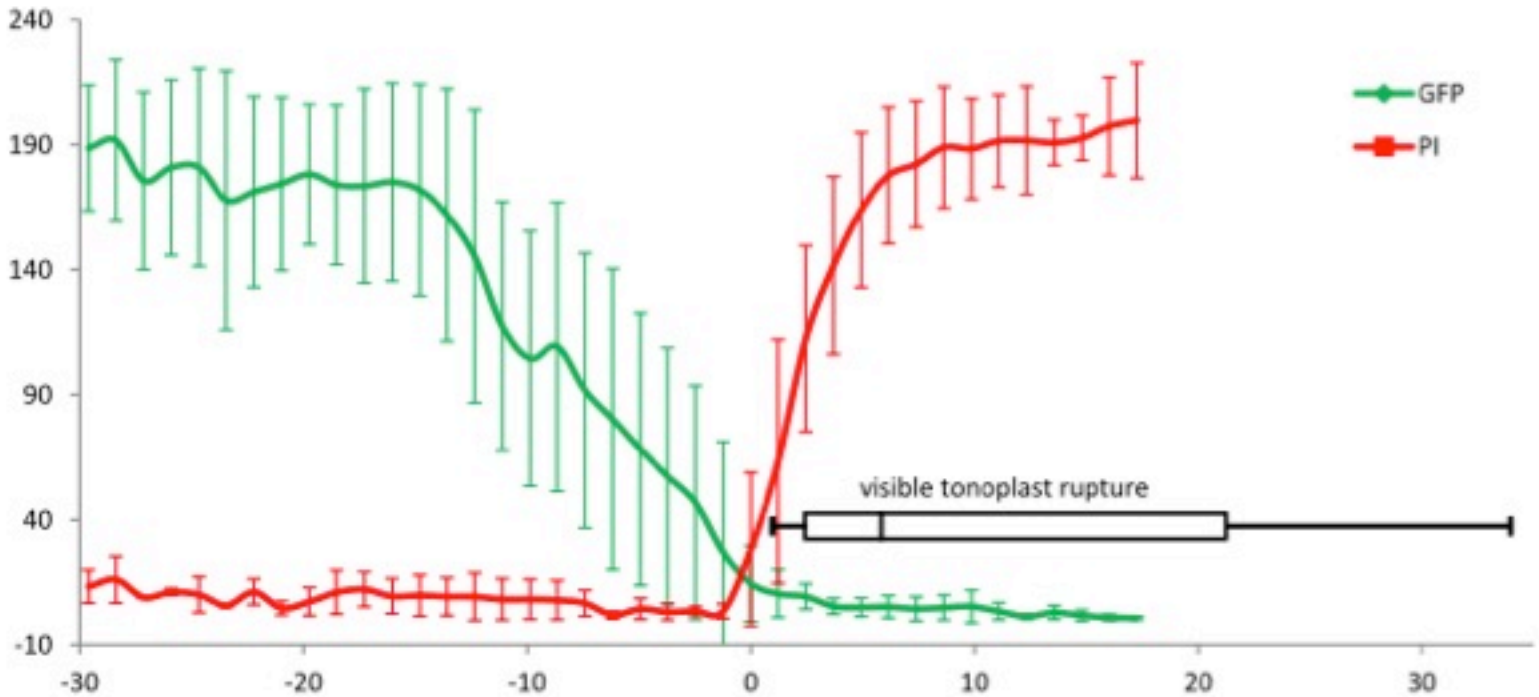
1. PRO_{PASPA3} Expression beginnt ~15h vor dem Zelltod



2. Verlust der GFP-Fluoreszenz ~15 min vor dem Zelltod
3. Propidium Iodid Eintritt: PM Permeabilisierung – Zeitpunkt des Todes
4. Kollaps der Vakuole ca. 12min nach PM Permeabilisierung

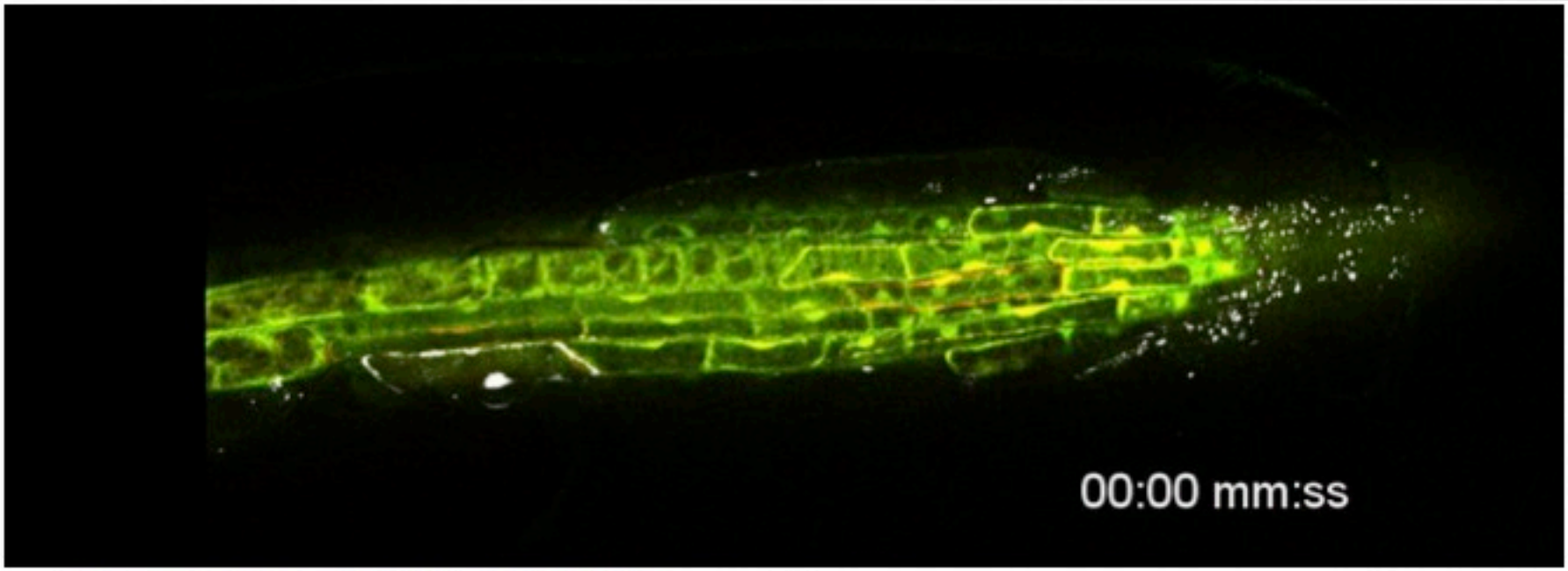
LCR Tod erfolgt in einer genau geregelten Abfolge

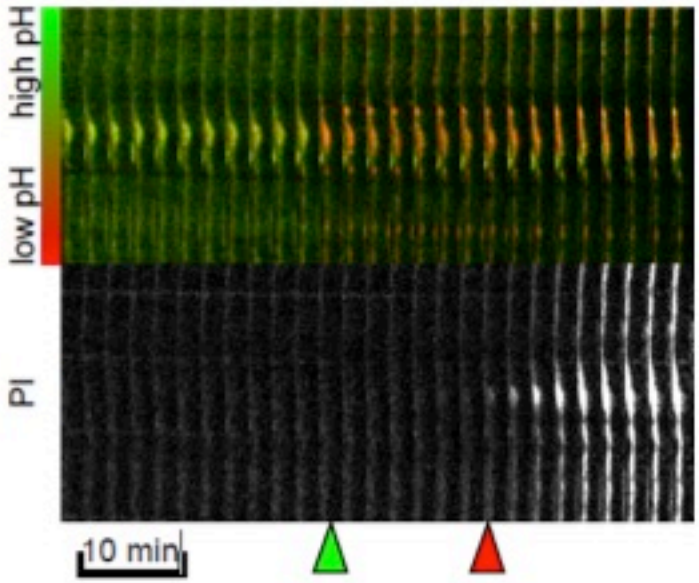
1. PRO_{PASPA3} Expression beginnt ~15h vor dem Zelltod

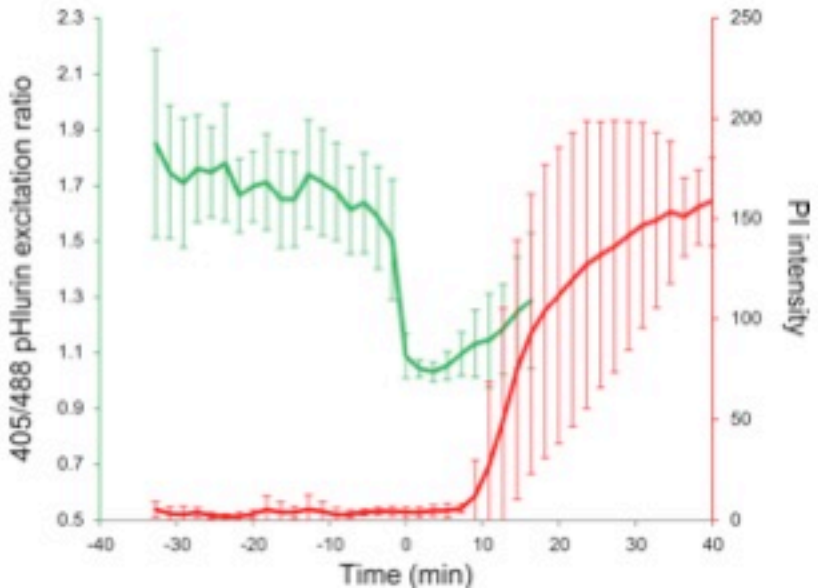


2. Verlust der GFP-Fluoreszenz ~15 min vor dem Zelltod
3. Propidium Iodid Eintritt: PM Permeabilisierung – Zeitpunkt des Todes
4. Kollaps der Vakuole ca. 12min nach PM Permeabilisierung

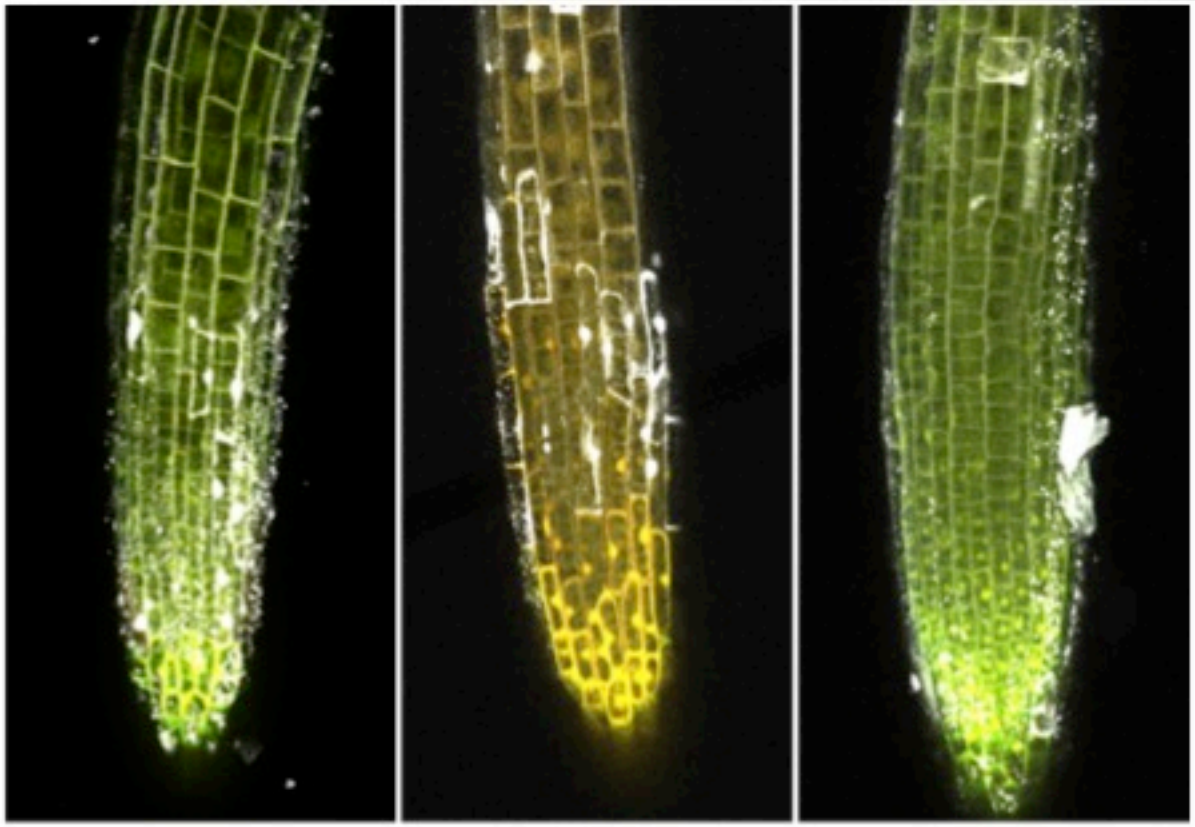
Eine zytoplasmatische Azidifizierung geht dem Zelltod voran



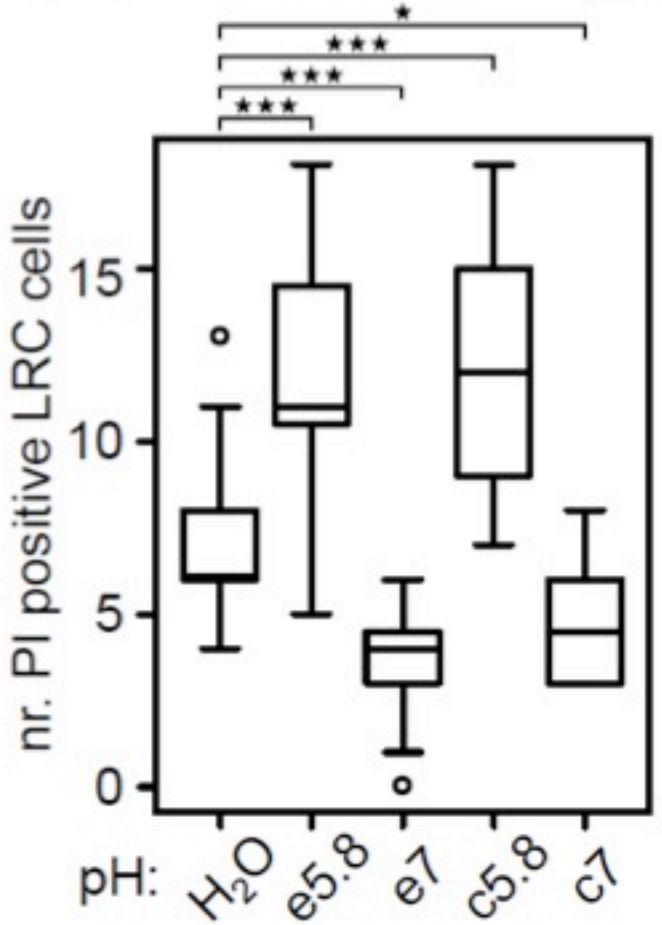




Eine zytoplasmatische Azidifizierung ist notwendig für den kontrollierten Zelltod



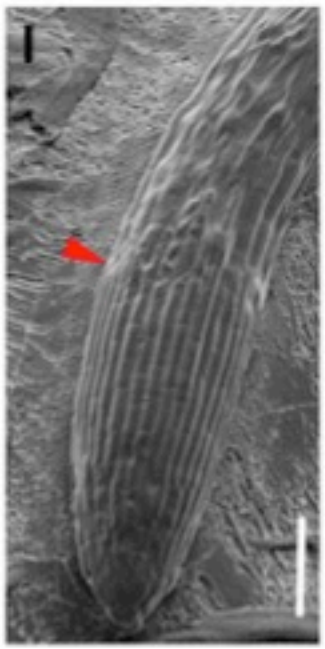
ungepuffert pH 5.8 pH 7

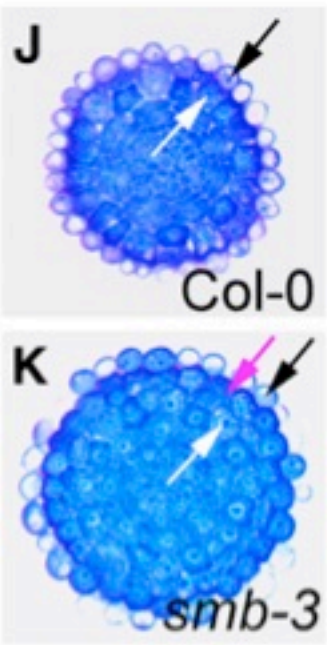


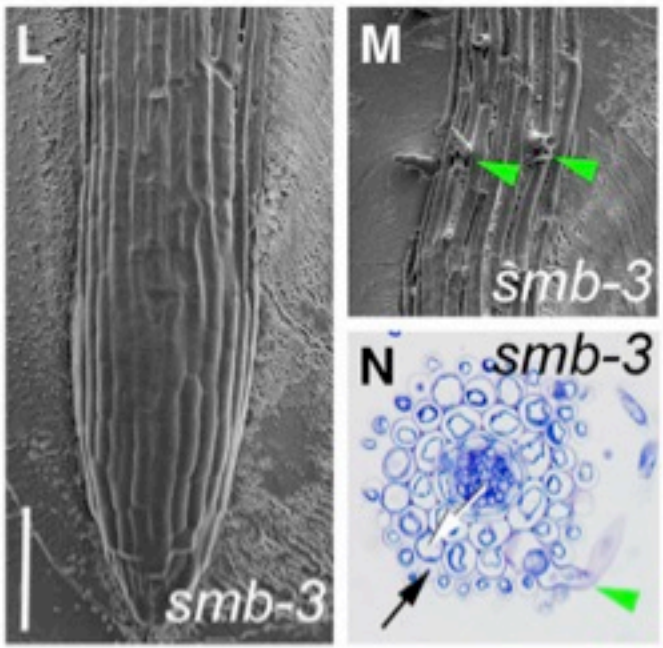
➔ Zytoplasamtischer **pH 5.8** -- gleiche Todesrate wie in der Kontrolle

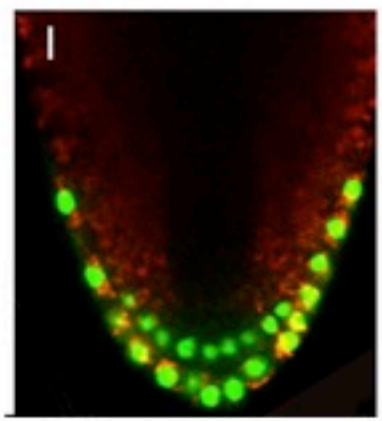
➔ Zytoplasamtischer **pH 7.0** -- signifikante Reduktion der Zelltodrate

Die *sombrero* Mutante zeigt eine verspätete LRC Differentierung





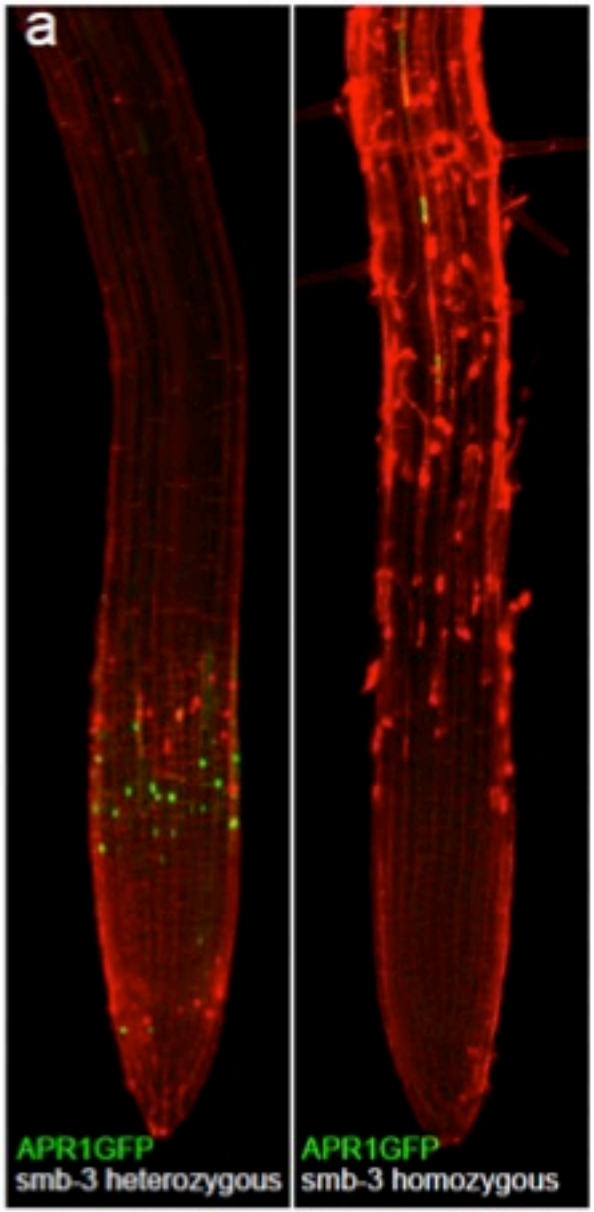


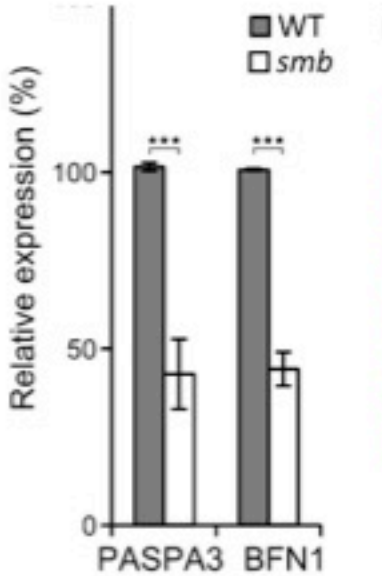


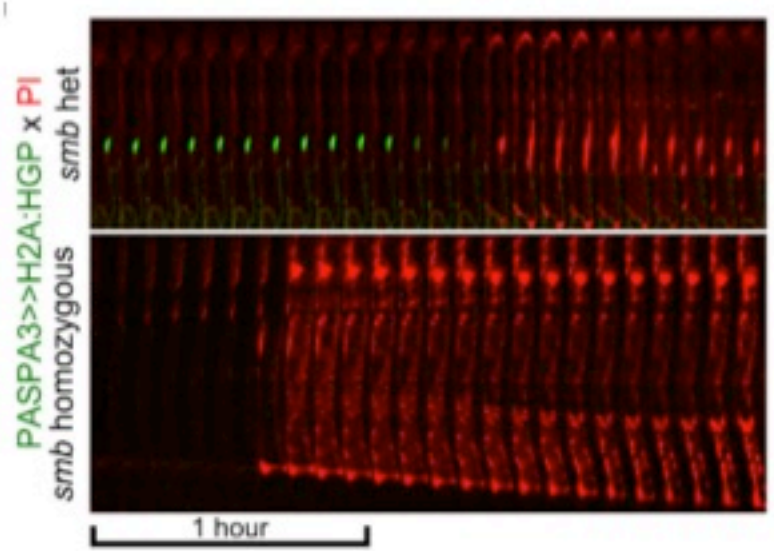
- *SMB* enkodiert einen Wurzelkappen-spezifischen NAC Transkriptionsfaktor
- *smb* LRC differenzieren später als im WT
- *smb* LRC-Zone ist grösser als im WT

Willemsen, Dev Cell 2008; Bennett, Plant Cell 2010

In der *sombrero* Mutante läuf der Zelltod der LCRs anders ab als im Wildtyp



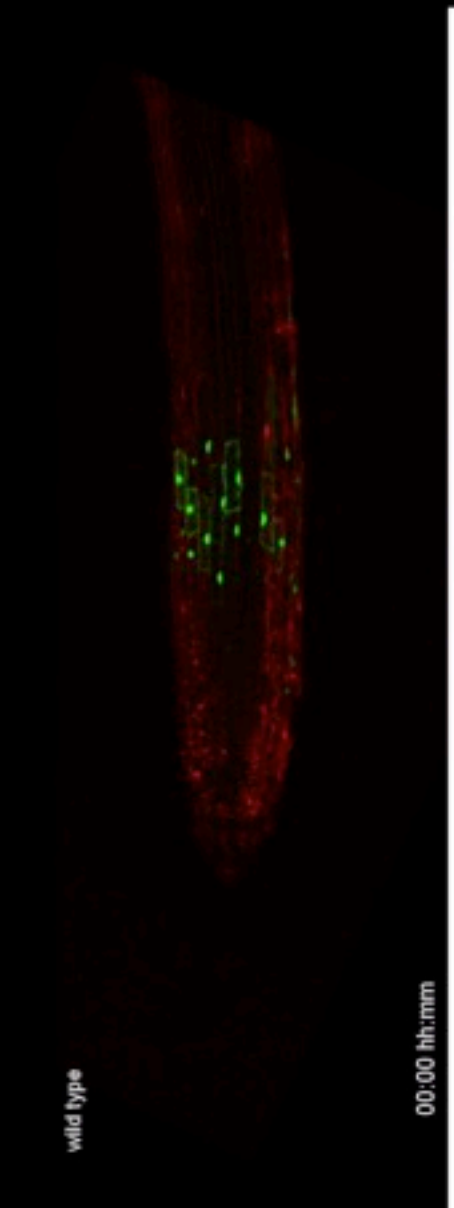


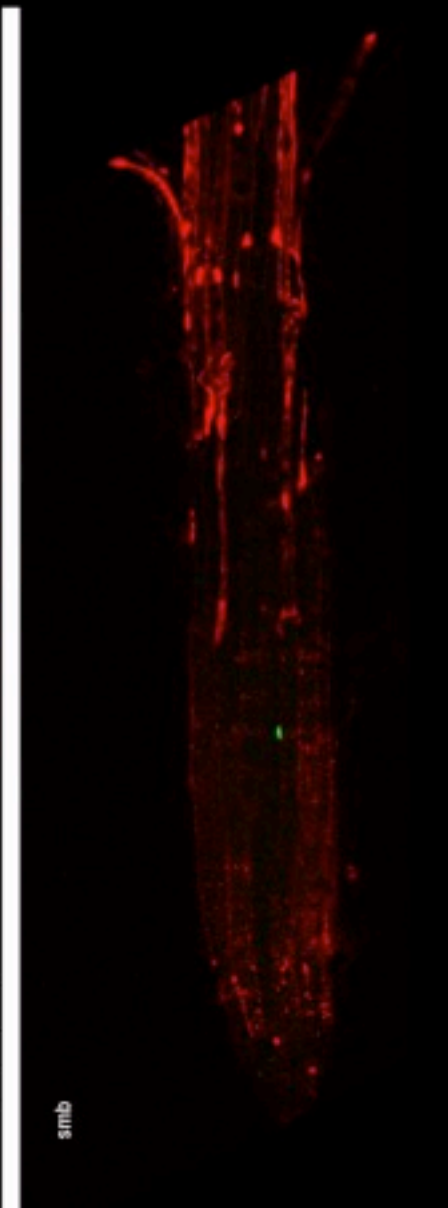


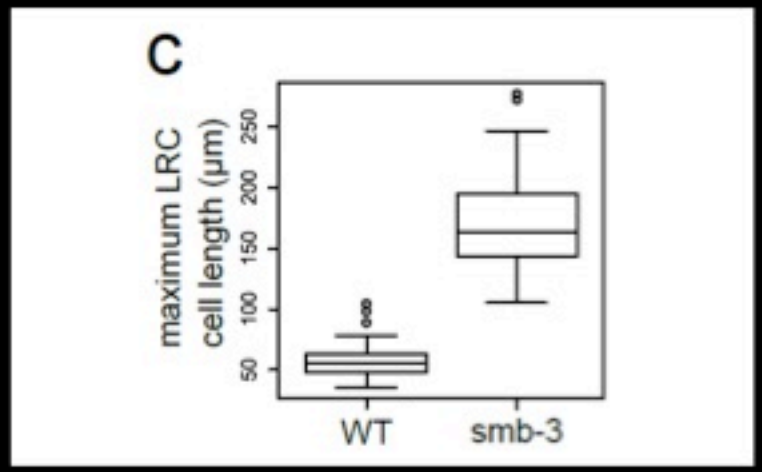
- PASPA3 und andere Zelltodreporter werden nicht in der distalen LCR exprimiert
- Zelltod ist verspätet und findet erst in der Elongationszone statt
- tote LCR-Zellen verbleiben auf der Wurzelepidermis

➔ **Der Zelltod der LRC in *smb* Mutanten ist fundamental unterschiedlich zu dem Tod der LCRs in WT**

In der *sombrero* Mutante läuf der Zelltod der LCRs anders ab als im Wildtyp

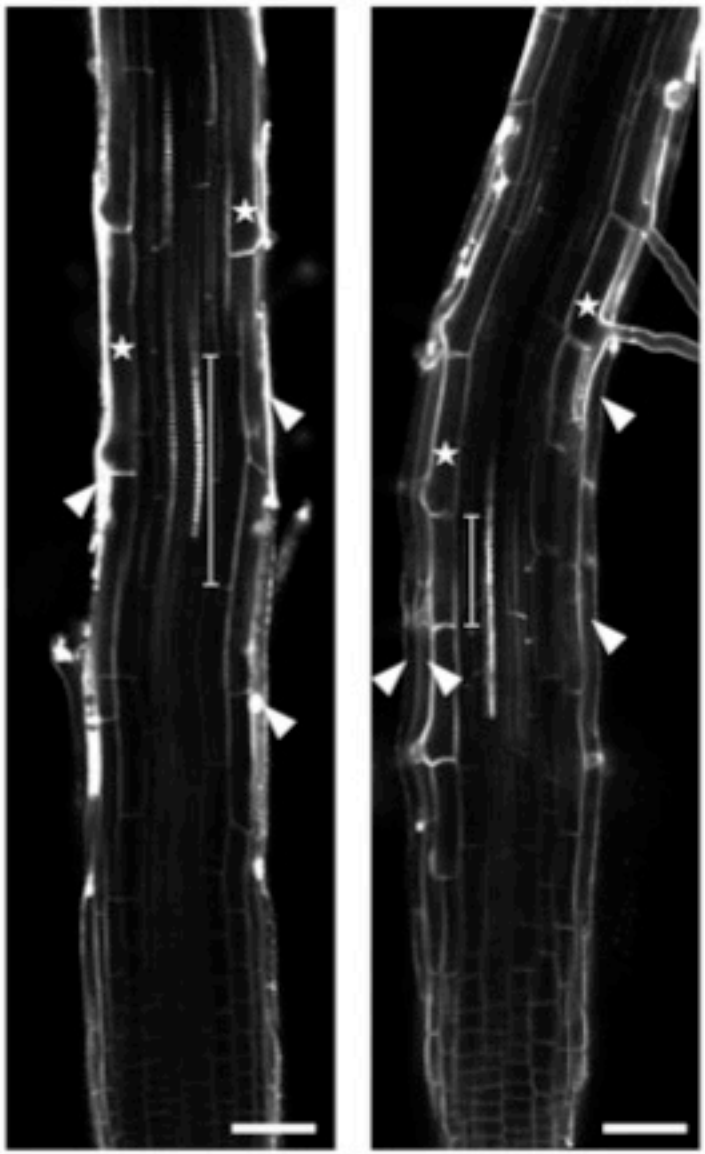






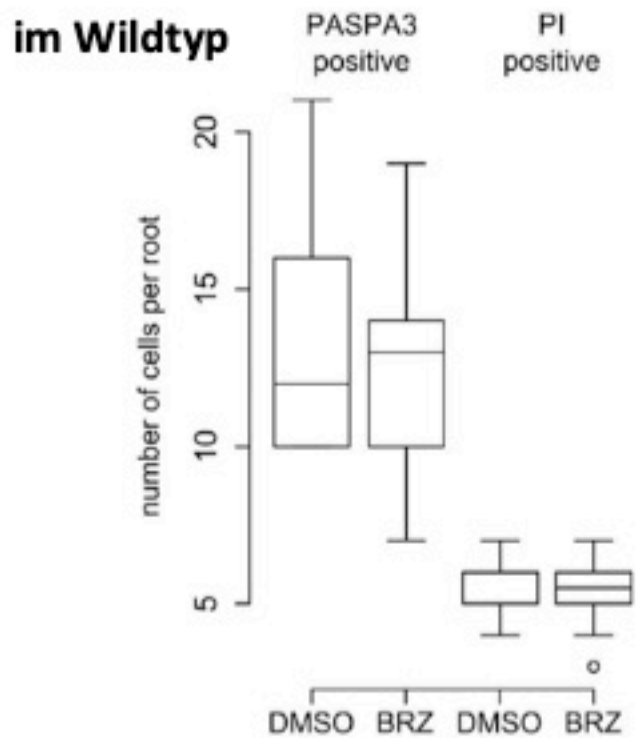
- Zelltod ist verspätet und findet erst in der Elongationszone statt
- LRC-Zellen in *smb* dehnen sich bis zu 300% der Länger im WT aus
- Plötzlicher, scheinbar unvorbereiteter Zelltod
- Vielleicht gar kein PCD sondern ein zerreissen der Zellen?

Der Zelltod in smb Mutanten scheint passive zu sein

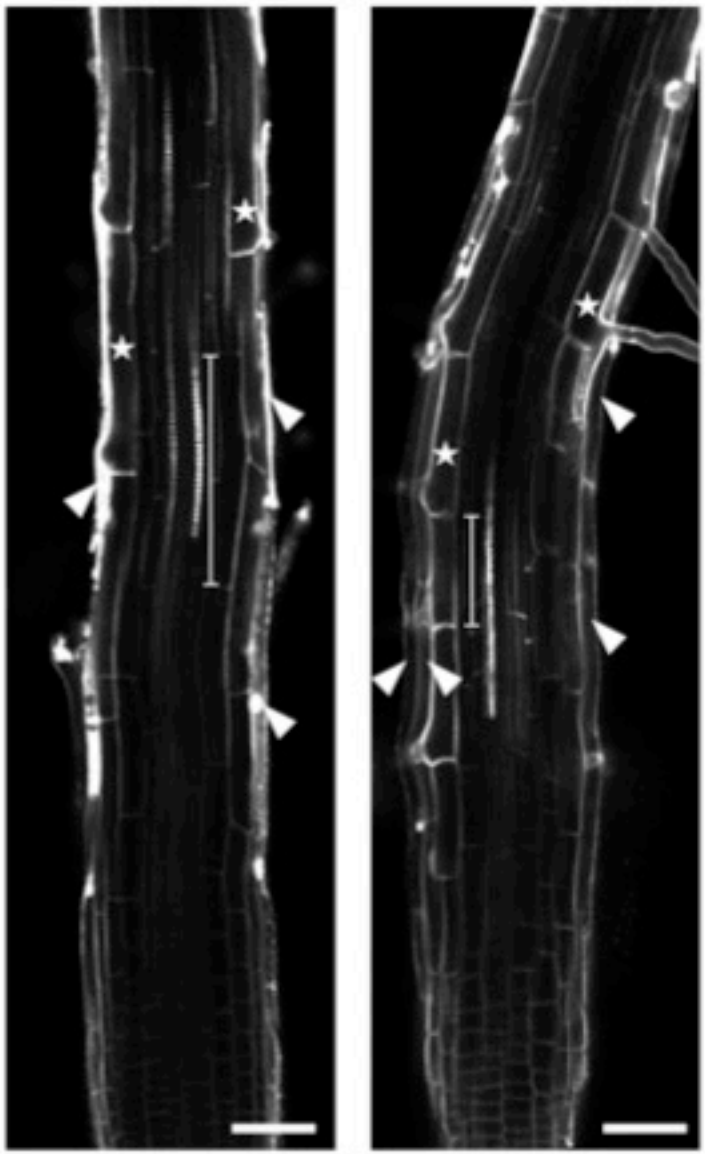


DMSO 10 µM Brassinazole

- BRZ reduziert die Zellelongation
- BRZ hat keinen Einfluss auf die PCD-Rate im Wildtyp
- BRZ reduziert massiv die PCD-Rate in *smb* Mutanten



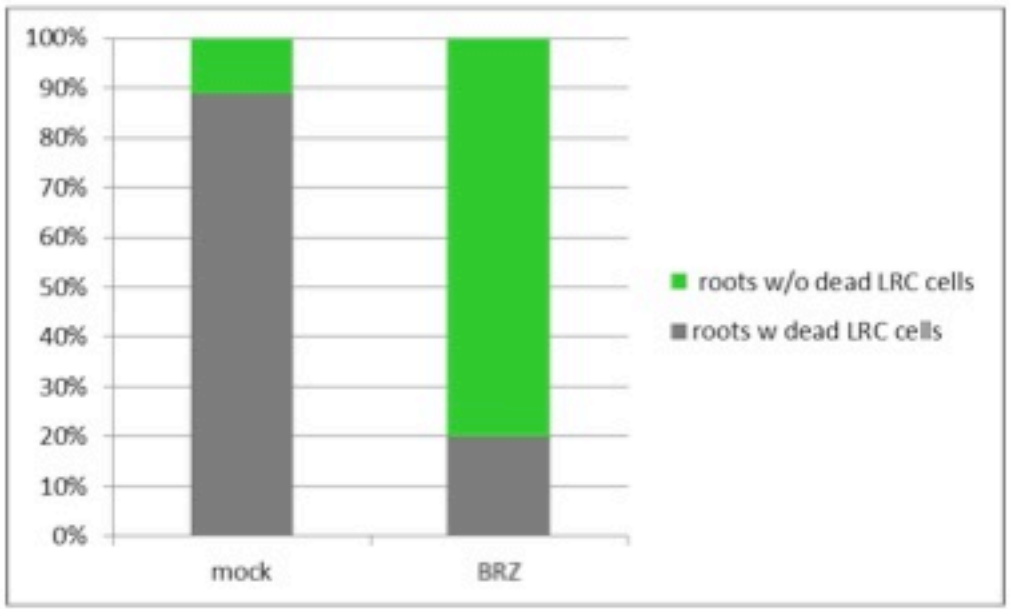
Der Zelltod in *sombrero* Mutanten scheint passive zu sein



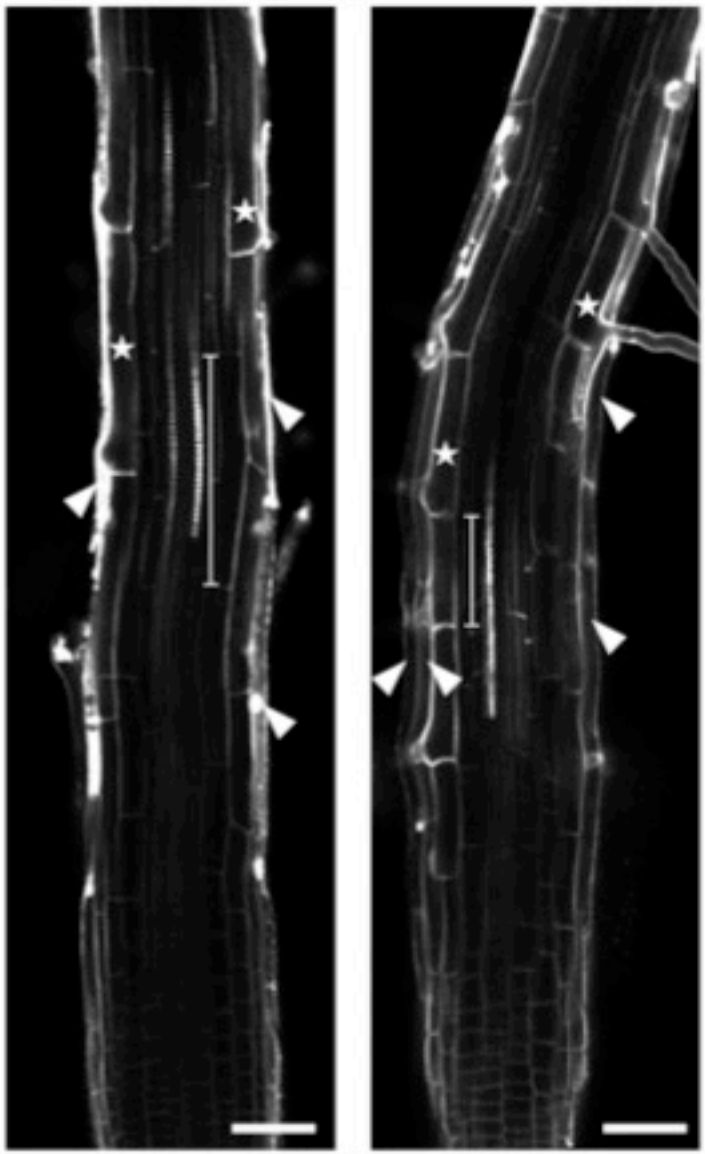
DMSO 10 µM Brassinazole

- BRZ reduziert die Zellelongation
- BRZ hat keinen Einfluss auf die PCD-Rate im Wildtyp
- BRZ reduziert massiv die PCD-Rate in *smb* Mutanten

in *smb* Mutanten



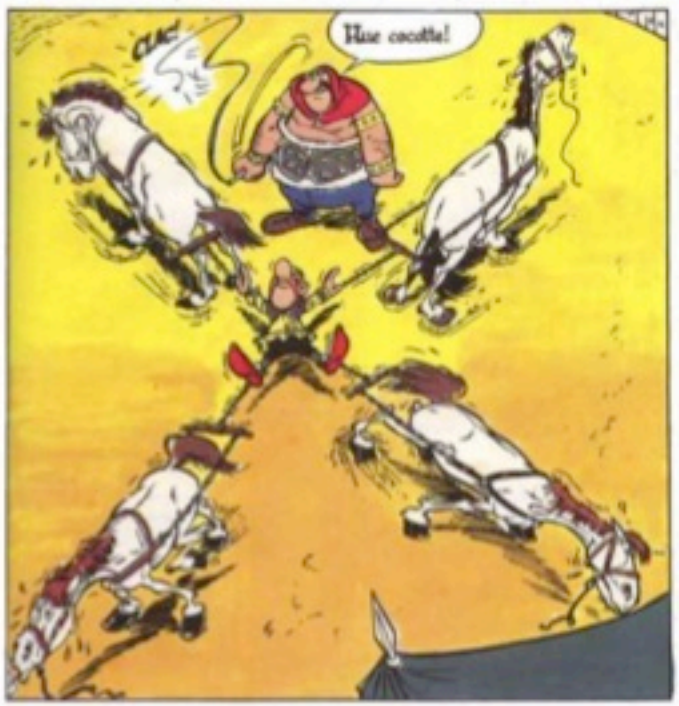
Der Zelltod in *smb* Mutanten scheint passive zu sein



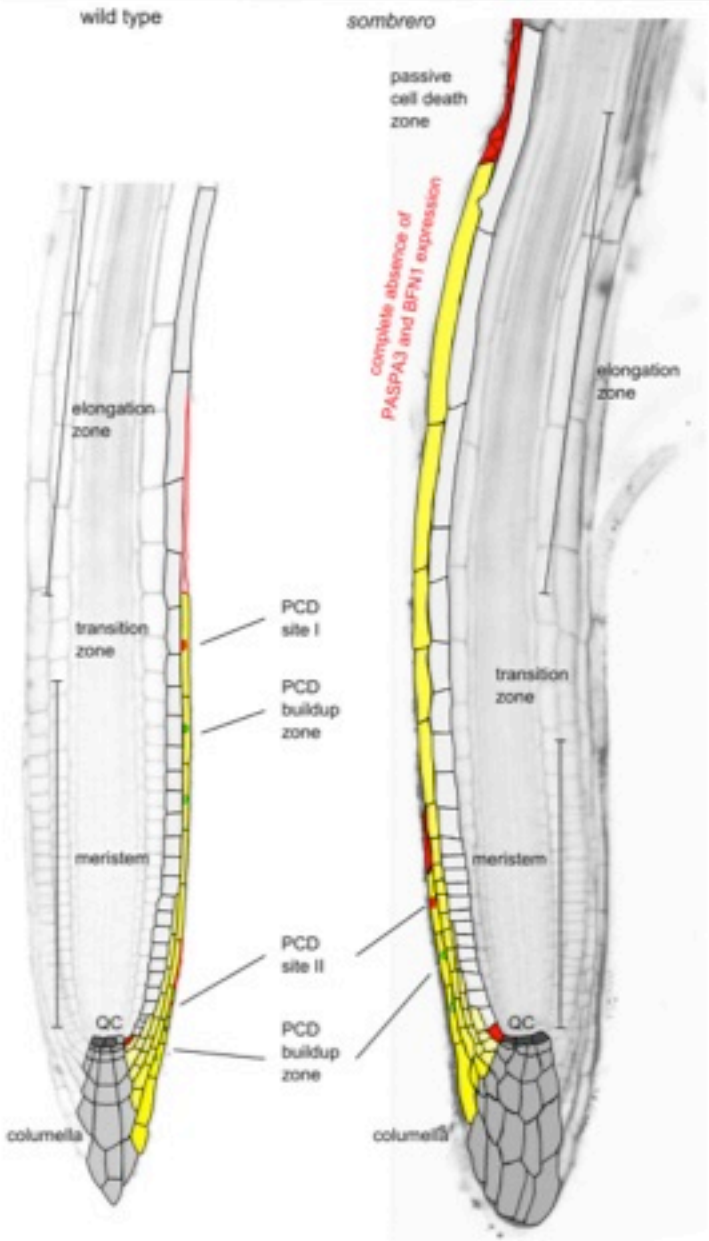
DMSO 10 µM Brassinazole

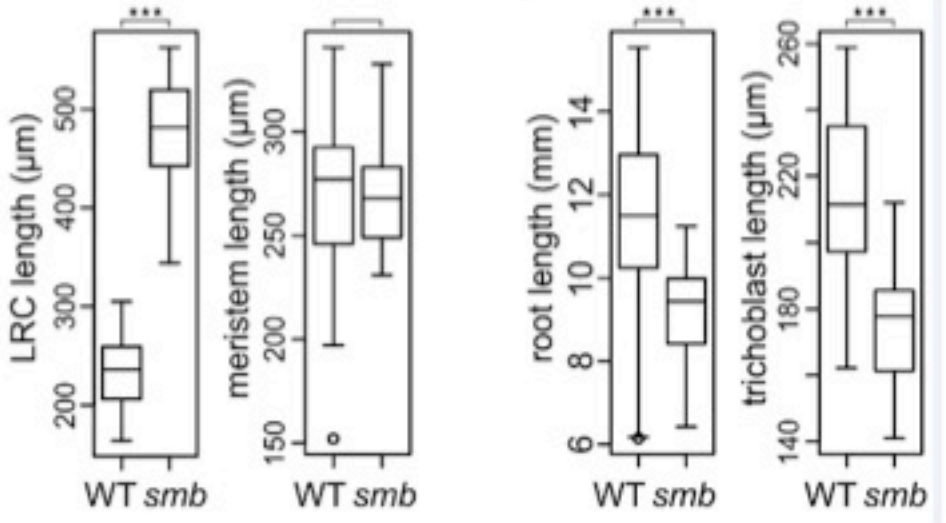
- BRZ reduziert die Zellelongation
- BRZ hat keinen Einfluss auf die PCD-Rate im Wildtyp
- BRZ reduziert massiv die PCD-Rate in *smb* Mutanten

➔ **passiver "non-PCD" durch Zerreissen der Zellen in *smb***



PCD der LRC ist wichtig für das Wurzelwachstum





- **LRC in *smb* ist grösser als im WT**
  - Entkoppelt von der Meristemgröße
- **Die Wurzellänge von *smb* Mutanten ist nur 80% der Länge im Wildtyp**
  - Reduzierte Epidermiselongation (80%)
  - Wahrscheinlich auf einer Behinderung durch eine nicht abgebaute LRC

Ende Teil VI